

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :
B01D 15/08

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 98/13118**

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum: 2. April 1998 (02.04.98)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/05093

(22) Internationales Anmeldedatum: 17. September 1997
(17.09.97)

(30) Prioritätsdaten:
196 41 210.2 25. September 1996 (25.09.96) DE
296 17 376.2 25. September 1996 (25.09.96) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): AN-
ALYTICON AG BIOTECHNOLOGIE PHARMAZIE
[DE/DE]; Gustav-Meyer-Allee 25, D-13355 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GUMM, Holger
[DE/DE]; Schönbaumer Weg 12, D-12503 Berlin
(DE). MÜLLER-KUHRT, Lutz [DE/DE]; Wublitzweg 12a,
D-14089 Berlin (DE).

(74) Anwälte: GULDE, Klaus, W. usw.; Gulde Hengelhaupt Ziebig,
Lützowplatz 11-13, D-10785 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: US, europäisches Patent (AT, BE, CH,
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE).

Veröffentlicht

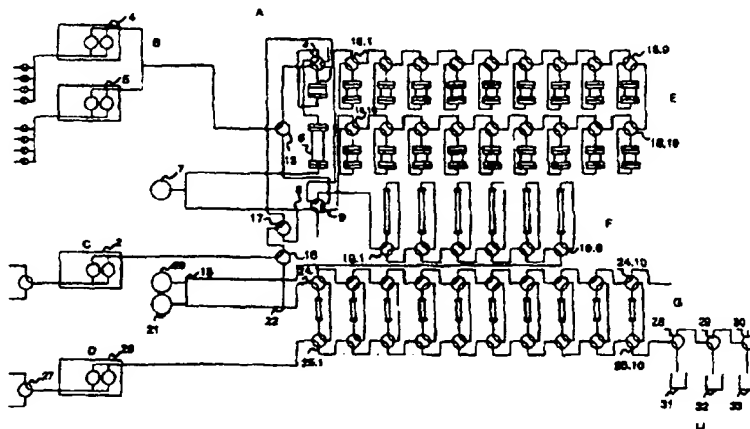
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen
Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen
eintreffen.

(54) Title: HPLC-BASED DEVICE AND METHOD FOR SEPARATING HIGH COMPLEX SUBSTANCE MIXTURES

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN AUF HPLC-BASIS ZUR TRENNUNG HOCHKOMPLEXER SUB-
STANZGEMISCHTE

(57) Abstract

The invention concerns an HPLC-based device and method for separating high complex substance mixtures. Plant and microbial extracts are high complex substance mixtures. They contain large amounts of extremely polar and non-polar materials. In principle, said mixtures can be separated by using a chromatographic method. However, separation with existing chromatographic devices, for instance HPLC installations, is extremely time-consuming. The invention seeks to create a HPLC installation that separates fully automatically high complex substances in a very short time in such a way that said substances are broken down into their components in an almost pure state and can then be fed into a test system. To this end, said HPLC-based device comprises separation column units (A, F), fractionating column units (E, G), detector units (7, and 20, 21), pumping units (B, C, D) and fraction collecting units. These units, including all separating or fractionating columns, are interconnected and controlled by multiple way valves and by a computer unit that ensures the software-controlled operational interaction of the device.



(57) Zusammenfassung

Die Erfindung bezieht sich auf eine Vorrichtung und ein Verfahren auf HPLC-Basis zur Trennung hochkomplexer Substanzgemische. Pflanzliche und mikrobielle Extrakte sind hochkomplexe Substanzgemische. Sie enthalten in großer Zahl sowohl extrem polare als auch unpolare Stoffe. Die Auftrennung dieser Gemische ist prinzipiell mit chromatischen Verfahren möglich. Allerdings ist der zeitliche Aufwand der Trennung mit den bisher bekannten chromatographischen Vorrichtungen, z.B. HPLC-Anlagen, unverträglich hoch. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde eine HPLC-Anlage anzubieten, die vollautomatisch in kürzester Zeit hochkomplexe Substanzgemische soweit auftrennt, daß seine Bestandteile nahezu rein vorliegen, die dann einem Testsystem zugeführt werden können. Die Lösung der Aufgabe erfolgt mit einer Vorrichtung auf HPLC-Basis, die Trennsäuleneinheiten (A, F), Fraktioniersäuleneinheiten (E, G), Detektoreinheiten (7 und 20, 21), Pumpeinheiten (B, C, D), Fraktionssammellereinheiten umfaßt, wobei diese Einheiten einschließlich jeder einzelnen Trenn- bzw. Fraktioniersäule über Mehr-Wege-Ventile ansteuerbar miteinander verbunden sind, sowie eine Rechneinheit für das softwaregesteuerte funktionelle Zusammenwirken der Vorrichtung.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

5

Vorrichtung und Verfahren auf HPLC-Basis zur Trennung
hochkomplexer Substanzgemische

10

Beschreibung

15 Die Erfindung bezieht sich auf eine Vorrichtung und ein
Verfahren auf HPLC-Basis zur Trennung hochkomplexer
Substanzgemische.

20 Mehr als ein Drittel der zur Zeit am Markt befindlichen
Arzneimittel enthalten Wirkstoffe, die die Natur zur
Verfügung gestellt hat, d.h. sie wurden aus Pflanzen
oder Mikroorganismen isoliert, oder aber zumindest auf
dieser Basis modifiziert.

25 Trotz dieser relativ hohen Anzahl an biologisch aktiven
Substanzen, die die Natur zur Verfügung hat, hat man
sich weltweit bisher mehr auf die chemische Synthese
als auf den sogenannten Naturstoffpool konzentriert. In
den letzten Jahren wurden jedoch neue Wirkstoffe ent-
30 deckt, die von der Natur geschaffen wurden, und dadurch
erlebt die Naturstoffchemie bzw. Naturstoffbiotechnolo-
gie eine Renaissance.

35 Gleichzeitig mit der Entdeckung bzw. Herstellung neuer
Wirkstoffe erfolgte eine schnelle Entwicklung auf dem
Sektor der Testsystemkapazitäten. Während derartige

biologische Assays zur Auffindung neuer potentieller Wirkstoffe noch vor Jahren einige 100 mg Substanz erforderlich waren und damit häufig lediglich nur geringe Durchsätze von Tests pro Jahr möglich waren, stellt sich die Situation gegenwärtig grundlegend anders dar. Infolge von Testdesigns, die z.B. die Hemmung eines spezifischen Enzyms als Maß für die biologische Aktivität annehmen, lassen sich miniaturisierte Testautomaten realisieren, mit denen sich durchaus eine Million Substanzen pro Jahr bei gleichzeitig niedrigstem Substanzverbrauch untersuchen lassen. Das Vorhandensein dieser enormen Testsystemkapazitäten kommt der Naturstoffforschung entgegen, denn von den aus Pflanzen oder mikrobiellen Fermentationen isolierten reinen Naturstoffen stehen häufig nur wenige Milligramm zur Verfügung, solange eine besondere biologische Aktivität noch nicht nachgewiesen werden konnte.

Obwohl bereits eine große Zahl von Naturstoffen bekannt sind, muß man davon ausgehen, daß die Natur noch eine viel größere Anzahl von Substanzen bereithält, die bisher unbekannt sind, so daß man an einem Hochdurchsatzscreening von einer großen Zahl pflanzlicher und mikrobieller Rohextrakte nicht vorbeikommt.

Die Prüfung natürlicher Extrakte erfordern allerdings eine langwierige Prozedur der Vorreinigung, Vortrennung, Zwischen- und Feinreinigung, die immer wieder unterbrochen werden müssen durch Testung auf biologische Aktivität. Diese Vorgehensweise erfordert einen hohen zeitlichen, personellen sowie logistischen Aufwand und führt darüberhinaus vielfach zu nicht weiter verfolgenswerten chemischen Substanzen.

In Anbetracht des Kostendruckes der aus dem Gesundheitswesen in die forschenden Einrichtungen hineingetragen wird, führen derartige Zeitverluste zu einer immer stärkeren Benachteiligung der auf der Naturstoffforschung basierenden Forschung und Entwicklung. Pflanzliche und mikrobielle Extrakte sind hochkomplexe Substanzgemische. Sie enthalten in großer Zahl sowohl extrem polare als auch unpolare Stoffe. Die Auftrennung dieser Gemische ist prinzipiell mit chromatischen Verfahren möglich. Allerdings ist der zeitliche Aufwand der Trennung mit den bisher bekannten chromatographischen Vorrichtung, z.B. HPLC-Anlagen, unvertretbar hoch.

Im BEO-Jahresbericht '94 des Bundesministeriums für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie, Seiten 413 und 414, ist eine HPLC-Anlage zur Naturstoffisolierung beschrieben, die pflanzliche und mikrobielle Extrakte grob- und feinfraktionieren soll.

Die Anlage weist folgende Nachteile auf:

- Die Zuschaltung hier genannter Fraktionssammelsäulen erfolgt über 12-Wege-Ventile, deren Einsatz bei präparativen Anwendungen sehr kostenaufwendig ist.
- Die hier erforderliche Häufigkeit der Schaltungen führt zu einem schnelleren Verschleiß von Bauteilen und Dichtungen.
- Ein variabler Einsatz entsprechend der zu trennenden Gemische durch Erweiterungen oder auch Verringerung der Anzahl der Säulen ist nicht möglich, d.h., ein modularer Aufbau der Anlage ist aufgrund dieser Konstruktion nicht durchführbar.
- Die große Anzahl von Fraktionssammelsäulen führt zu einer zu langen Laufzeit und zu einem hohen Lösungsmittelverbrauch.

- Ein kostengünstiger und zeitsparender Roll-over-Betrieb ist nicht durchführbar.
- Die hier vorgesehene isokratische Trennung im zweiten Trennschritt führt ebenfalls zu einer nachteiligen
5 Verlängerung der Laufzeit.

Der Erfindung liegt nun die Aufgabe zugrunde eine HPLC-Anlage anzubieten, die vollautomatisch in kürzester Zeit hochkomplexe Substanzgemische soweit auftrennt,
10 daß seine Bestandteile nahezu rein vorliegen, die dann einem Testsystem zugeführt werden können.

Die Lösung der Aufgabe erfolgt mit einer Vorrichtung und einem Verfahren auf HPLC-Basis gemäß der Ansprüche
15 1 und 22.

Die erfindungsgemäß zugrunde gelegte Technologie der Auftrennung der Extrakte ist die Hochdruckflüssig-Chromatographie, die in der Lage ist, sowohl relativ polare als auch unpolare Verbindungen zu trennen.
20 Aufgrund der hohen Anzahl von Substanzen in einem komplexen Substanzgemisch wie z.B. in pflanzlichen und mikrobiellen Extrakten, ist die Trennung in einem Schritt nicht möglich. Es ist vielmehr die erfindungsgemäße Kombination mehrerer
25 Trennsäulensysteme erforderlich, um in vertretbarer Zeit eine Auftrennung zu erreichen.

Die Erfindung weist verschiedene Vorteile auf. So ermöglicht die Erfindung in einer Anlage eine Grob- und
30 eine Feintrennung vorzunehmen und zwischenzeitlich abgetrennte Fraktionen abrufbereit auf festen Phasen zu speichern, so daß innerhalb kürzester Zeit mittels der softwaregesteuerten Vorrichtung eine praktisch vollständige Auftrennung aller Substanzfraktionen
35 erreicht werden kann. Dadurch ist es denkbar, daß bei

günstiger Infrastruktur, also das Vorhandensein entsprechender Testsysteme verbunden mit einer Strukturaufklärung innerhalb von 2 bis 3 Tagen eine Identifizierung der wirksamen Komponente eines Extraktes zu ermöglichen. Das bedeutet eine extreme Beschleunigung des Wirkstofffindungsprozesses, der ausgehend von Naturstoffgemischen wie pflanzliche oder mikrobielle Extrakte üblicherweise Monate dauert. Vorteilhafterweise weist die erfindungsgemäße Vorrichtung einen modularen Aufbau auf, der Erweiterungen in Abhängigkeit von der Komplexität zu trennender Substanzgemische ermöglicht.

Die Erfindung wird anhand einer Zeichnung näher erläutert.

Es zeigt

Fig. 1 den Aufbau und Ablaufschema der Vorrichtung.

Das zu trennende Multikomponent-Gemisch (z.B. Pflanzenextrakt, mikrobieller Extrakt usw.) wird in Methanol gelöst und mit RP-4-Material (Korngröße ca. 40 μm) in folgendem Verhältnis 1 Massenteil Extrakt zu 3 Massenteilen RP-4-Material versetzt. Von diesem Gemisch wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, so daß eine rieselfähige Mischung aus Extrakt und RP-Material entsteht. Die Mischung wird in eine Aufgabesäule 1 trocken verfüllt und in die Trennsäuleneinheit A eingebaut.

30

Mit einer Pumpe 2 und als Eluent Wasser wird über die 3-Wege-Ventile 16, 17 und über ein 6-Wege-Ventil 3 die Luft aus der trockenverfüllten Aufgabesäule 1 entfernt. Wenn die Luft entfernt ist, wird das Trennprogramm ge-

startet. Das Trennprogramm wird über eine Software gesteuert.

5 Mit einer Pumpe 4 und einer Pumpe 5 der Pumpeinheit B wird ein Gradient von 0% bis 100% des mit der Pumpe 5 geförderten Laufmittels bzw. Elemente mit einer Laufzeit von 60 min gefahren, wobei es sich bei Pumpe 4 um eine wäßrige Puffer-Lösung und bei Pumpe 5 um Methanol handelt. Die Komponenten des Extraktes werden in Abhängigkeit ihrer Polarität von der Aufgabesäule 1 über das 6-Wege-Ventil 3 auf die Trennsäule 6 gespült. Die Trennsäule 6 ist mit RP-4-Material gefüllt. In einem UV-Detektor 7 werden die Komponenten detektiert und mit der Software aufgezeichnet. Die Komponenten gelangen zu einem T-Stück 8, wo über die Pumpe 2 und die 3-Wege-Ventile 16, 17 Wasser zum Eluent dosiert und dadurch die Polarität der Lösung erhöht wird. Danach gelangt dieses Eluat über ein 6-Wege-Ventil 9 zu einer Fraktionssäuleneinheit E, die aus 18 Fraktioniersäulen besteht.

25 Die Fraktioniersäulen der Fraktioniersäuleneinheit E sind mit verschiedenen Sorbentien gefüllt, an denen durch Festphasenextraktion die Komponenten extrahiert werden.

30 Jede Fraktioniersäule wird für einen Zeitraum von 3 - 4 min geschaltet. Die Fraktioniersäulen werden über jeweilige 4-Wege-Ventile 18.1 bis 18.18 in den Eluentenstrom geschaltet. Dadurch wird der 60-minutige Gradient in 18 Fraktionen aufgeteilt. Das komponentenfreie Eluat gelangt über das 6-Wege-Ventil 9 in den Abfall.

35 Jede einzelne der auf den 18 Fraktioniersäulen gespeicherten Fraktionen wird über eine der sechs Trennsäulen

einer Trennsäuleneinheit F weiter aufgetrennt. Dabei wird über die Pumpe 4 und Pumpe 5 der Pumpeinheit B, über das 3-Wege-Ventil 13, das 6-Wege-Ventil 9 und über das entsprechende 4-Wege-Ventil 18.1 bis 18.18 die Komponenten rückwärts von einer der Fraktioniersäulen auf eine der sechs Trennsäulen der Trennsäuleneinheit F gespült und die Komponenten weiter aufgetrennt. Die sechs Trennsäulen werden über entsprechende 4-Wege-Ventile 19.1 bis 19.6 geschaltet.

Die getrennten Komponenten gelangen nach der Trennsäuleneinheit F in ein Split-Ventil 15, wo ein Teil (ca. 1/40) des Volumenstromes einem Lichtstredetektor 20 zugeführt wird. Der restliche Volumenstrom gelangt über einen weiteren UV-Detektor zu einem T-Stück 22, wo über die Pumpe 2 und ein 3-Wege-Ventil 16 Wasser zum Eluat dosiert und dadurch die Polarität der Lösung erhöht wird. Dieses Eluat gelangt dann zu einer Fraktionssäuleneinheit G, die über zehn 4-Wege-Ventile 14.1 bis 14.10 geschaltet und mit den getrennten Komponenten beschichtet wird, dabei werden durch das Säulenmaterial die Komponenten aus dem Eluat extrahiert. Die Steuerung dieser Ventile erfolgt durch eine Kombination von Peakerkennung der Detektoren 20, 21 und durch Zeitsteuerung.

Die Ventile werden von dem Steuerungsprogramm so gesteuert, daß, wenn die erste Fraktioniersäule beladen ist, mit Hilfe einer Pumpe 26 einer Pumpeinheit D über ein 3-Wege-Ventil 27 Methanol über das entsprechende 4-Wege-Ventil 25.1 auf die erste Fraktioniersäule gefördert wird und die Komponenten über die 3-Wege-Ventile 28, 29, 30 in einen der Fraktionssammler 31, 32, 33 der Fraktionssammlereinheit H gespült werden. Die freigespülte Fraktioniersäule wird mit Wasser über das 3-Wege-Ventil 27 mittels Pumpe 26 und über das

entsprechende 4-Wege-Ventil 25.1 für die nächste Fraktionierung konditioniert.

5 Dadurch können mehr als 10 Fraktionen bearbeitet werden, weil gleichzeitig auf Fraktioniersäulen fraktioniert wird und auch Fraktioniersäulen gespült und konditioniert und damit für eine weitere Fraktionierung vorbereitet werden.

Vorrichtung und Verfahren auf HPLC-Basis zur Trennung
hochkomplexer Substanzgemische

Bezugszeichenliste

1	Aufgabesäule	24	4-Wege-Ventil (24.1-24.10)
2	Pumpe (C)	25	4-Wege-Ventil (25.1-25.10)
3	6-Wege-Ventil	26	Pumpe (D)
4	Pumpe (B)	27	3-Wege-Ventil
5	Pumpe (B)	28	3-Wege-Ventil
6	Trennsäule	29	3-Wege-Ventil
7	UV-Detektor	30	3-Wege-Ventil
8	T-Stück	31	Fraktionssammler
9	6-Wege-Ventil	32	Fraktionssammler
13	3-Wege-Ventil	33	Fraktionssammler
15	Splitt-Ventil	A	Trennsäuleneinheit
16	3-Wege-Ventil	B	Pumpeinheit
17	3-Wege-Ventil	C	Pumpeinheit
18	4-Wege-Ventil (18.1-18.18)	D	Pumpeinheit
19	4-Wege-Ventil (19.1-19.6)	E	Fraktioniersäuleneinheit
20	Lichtstreuendetektor	F	Trennsäuleneinheit
21	UV-Detektor	G	Fraktioniersäuleneinheit
22	T-Stück	H	Fraktionssammlereinheit

Patentanspruch

1. Vorrichtung auf HPLC-Basis zur Trennung
hochkomplexer Substanzgemische, umfassend
5 - Trennsäuleneinheiten (A, F)
 - Fraktioniersäuleneinheiten (E, G)
 - Detektoreinheiten (7 und 20, 21)
 - Pumpeinheiten (B, C, D)
 - Fraktionssammelereinheiten,
10 wobei diese Einheiten einschließlich jeder einzel-
nen Trenn- bzw. Fraktioniersäule über Mehr-Wege-
Ventile ansteuerbar miteinander verbunden sind,
und
eine Rechneinheit für das softwaregesteuerte
15 funktionelle Zusammenwirken der Vorrichtung.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß sie mindestens zwei Trennsäuleneinheiten (A, F)
aufweist.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2,
25 dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens zwei
Fraktioniereinheiten (E, G) aufweist.
4. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2,
30 dadurch gekennzeichnet,
daß sie mindestens eine Detektoreinheit (20, 21)
aufweist.

5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie mindestens drei Pumpeinheiten (B, C, D)
5 aufweist.
6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
10 daß die Trennsäuleneinheiten (A, F) und Fraktionier-
säuleneinheiten (E, G) alternierend angeordnet sind.
7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
15 dadurch gekennzeichnet,
daß eine Trennsäuleneinheit (A) eine in Reihe ge-
schaltete Aufgabesäule und eine Trennsäule enthält,
und die weiteren Trennsäuleneinheiten (F)
mindestens zwei Trennsäulen umfassen.
20
8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Trennsäuleneinheit (A) aus einer Aufgaben-
25 schleife und einer Trennsäule besteht.
9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
30 daß mindestens zwei Detektoreinheiten (7, 20, 21)
enthalten sind, die zwischen Trennsäuleneinheiten (A,
F) und Fraktioniereinheiten (E, G) angeordnet sind.
- 35 10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9,

dadurch gekennzeichnet,
daß sie mindestens eine Detektoreinheit (20, 21)
aus einem selektiv und einem nicht selektiv messen-
den Detektor aufweist.

5

11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Detektoren UV- und Lichtstreuendetektoren sind.

10

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie einen massenselektiven Detektor wie ein
Massenspektrometer aufweist.

15

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens drei Pumpeinheiten (B, C, D) enthal-
ten sind, wobei mindestens eine Pumpeinheit (B)
mindestens zwei Hochdruckgradientenpumpen aufweist.

20

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Pumpeinheiten (B, C, D) über Mehr-Wege-Ven-
tile mit den Fraktioniersäuleneinheiten (E, G) und
den Trennsäuleneinheiten (A, F) verbunden sind.

25

30

15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Trennsäulen der Trennsäuleneinheiten (A, F)
mit Reversed-Phase-Materialien (RP) gefüllt sind.

35

16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Trennsäulen der Trennsäuleneinheit (A, F)
5 und die Fraktioniersäulen der Fraktioniersäulenein-
heiten (E, G) mit Normal- und Reversed-Phase-Mate-
rialien gefüllt sind.
- 10 17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Trennsäulen und Fraktioniersäulen mit
Kieselgel, mit modifizierten Kieselgelen wie RP-2,
RP-4, RP-8, RP-18, Amino, Cyano, Phenyl, Diol,
15 Anionenaustauscher und Kationenaustauscher und/oder
mit Polymerphasen gefüllt sind.
18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 17,
20 dadurch gekennzeichnet,
daß die Pumpeinheit (B), die Trennsäuleneinheit (A)
und die Fraktioniersäuleneinheit (E) über ein 6-
Wege-Ventil (3) ansteuerbar miteinander verbunden
sind.
- 25 19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Fraktioniersäuleneinheit (E) und die Trenn-
säuleneinheit (F) über ein 6-Wege-Ventil ansteuer-
30 bar miteinander verbunden sind.
20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 19,
35 dadurch gekennzeichnet,

daß die Fraktioniersäulen der Fraktioniersäuleneinheit (E) und die Trennsäulen der Trennsäuleneinheit (F) je ein 4-Wege-Ventil aufweisen (18.1-18.18 und 19.1-19.6).

5

21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Fraktioniersäulen der Fraktioniersäuleneinheit (G) je zwei 4-Wege-Ventile (24.1-14.10 und 25.1-25.10) aufweisen.

10

22. Verfahren auf HPLC-Basis zur Trennung hochkomplexer Substanzgemische, umfassend die folgenden Stufen

15

- Gradiententrennung eines hochkomplexen Substanzgemisches in einer ersten Trennsäuleneinheit (A) in eine definierte Anzahl von Fraktionen mittels einer Pumpeinheit (B)

20

- Erhöhung der Polarität des Eluenten durch Wasserzugabe über eine Pumpeinheit (C)

25

- Überführung der Fraktionen in eine erste Fraktioniersäuleneinheit (G), deren Säulenanzahl der Anzahl der getrennten Fraktionen entspricht, und Adsorption der vorher aufgetrennten Fraktionen auf je eine Fraktioniersäule durch Festphasenextraktion

30

- sequenzielles Überspülen der in der ersten Fraktioniersäuleneinheit (E) adsorbierten Fraktionen mit weniger polaren Eluenten in eine zweite Trennsäuleneinheit (F) und weitere Auftrennung mit schwachem Gradienten mittels der Pumpeinheit (B)

- Erhöhung der Polarität des Eluenten durch Wasserzugabe über eine Pumpeinheit (C)
- sequenzielle Überführung der weiter aufgetrennten Fraktionen entsprechend der Signale der Detektoreinheit (20, 21) in eine Fraktioniersäuleneinheit (G) und der Adsorption jeder Fraktion auf eine Fraktioniersäule durch Festphasenextraktion
- sequenzielles Überspülen der Fraktionen von der Fraktioniersäuleneinheit (G) in die Fraktions-
sammelereinheit (H) mittels einer Pumpeinheit (D)
und eines weniger polaren Eluenten und anschließend
Konditionieren der freigespülten Fraktions-
säule mittels der Pumpeinheit (D),
wobei der Transport der mobilen Phase und die zwischenzeitlich erforderlichen Konditionierungs- bzw. Äquilibrationsschritte der einzelnen Säulen in den Trennsäuleneinheiten durch Steuerung der Pumpeinheiten (B, C, D), der Schaltung der Mehr-Wege-Ventile und der Fraktionssammler unter Verarbeitung der Signale der Detektoreinheiten (7 und 20, 21) über eine Rechneinheit erfolgt.

23. Verfahren nach Anspruch 25,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Zugang der mobilen Phase zu jeder einzelnen Trennsäule der Trennsäuleneinheit (F) und zu jeder einzelnen Fraktioniersäule der Fraktioniersäuleneinheiten (E, G) separat rechnergesteuert über 4-Wege-Ventile durchgeführt wird.

24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23,
dadurch gekennzeichnet,

daß nach Freispülung einer Fraktioniersäule der Fraktioniersäuleneinheit (G) in einen Fraktions-
sammeler (31, 32, 33) der Fraktionssammelereinheit
(H) mittels der Pumpeinheit (D) die Fraktionier-
säule mit Wasser für die nächste Fraktionierung
konditioniert wird (Roll-over-Betrieb).

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 24,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Zuführung des hochkomplexen Substanzgemisches zur Vorrichtung über eine Aufgabensäule erfolgt.

26. Verfahren nach Anspruch 25,
dadurch gekennzeichnet,
daß das hochkomplexe Substanzgemisch mit einem Sorbent vermischt wird, in einem Lösungsmittel wie Methanol suspendiert, danach das Lösungsmittel abgetrennt und der mit dem komplexen Substanzgemisch beladene Sorbent in die Aufgabensäule gefüllt wird.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 26,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Trennung des Substanzgemisches in der Trennsäuleneinheit (A) mit einem Gradient erfolgt, der eine zunehmende Lipophilie aufweist.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 27,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Eluenten wäßrige Pufferlösungen und lipophile Lösungsmittel eingesetzt werden.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 28,
dadurch gekennzeichnet,
daß als lipophilere Lösungsmittel Lösungsmittel wie
Acetonitril, Methanol, Tetrahydrofuran und
Isopropanol eingesetzt werden.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 29,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein Peakerkennungsprogramm eingesetzt wird, das
es erlaubt die Anzahl der Fraktionen zu optimieren.

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 30,
dadurch gekennzeichnet,
daß in den Säulen der Fraktioniersäuleneinheit (E,
G) entsprechend der Polarität der Fraktion unter-
schiedliche Sorbentien eingesetzt werden.

32. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 31,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Freispülung der Fraktioniersäulen im Back-
flush-Verfahren erfolgt.

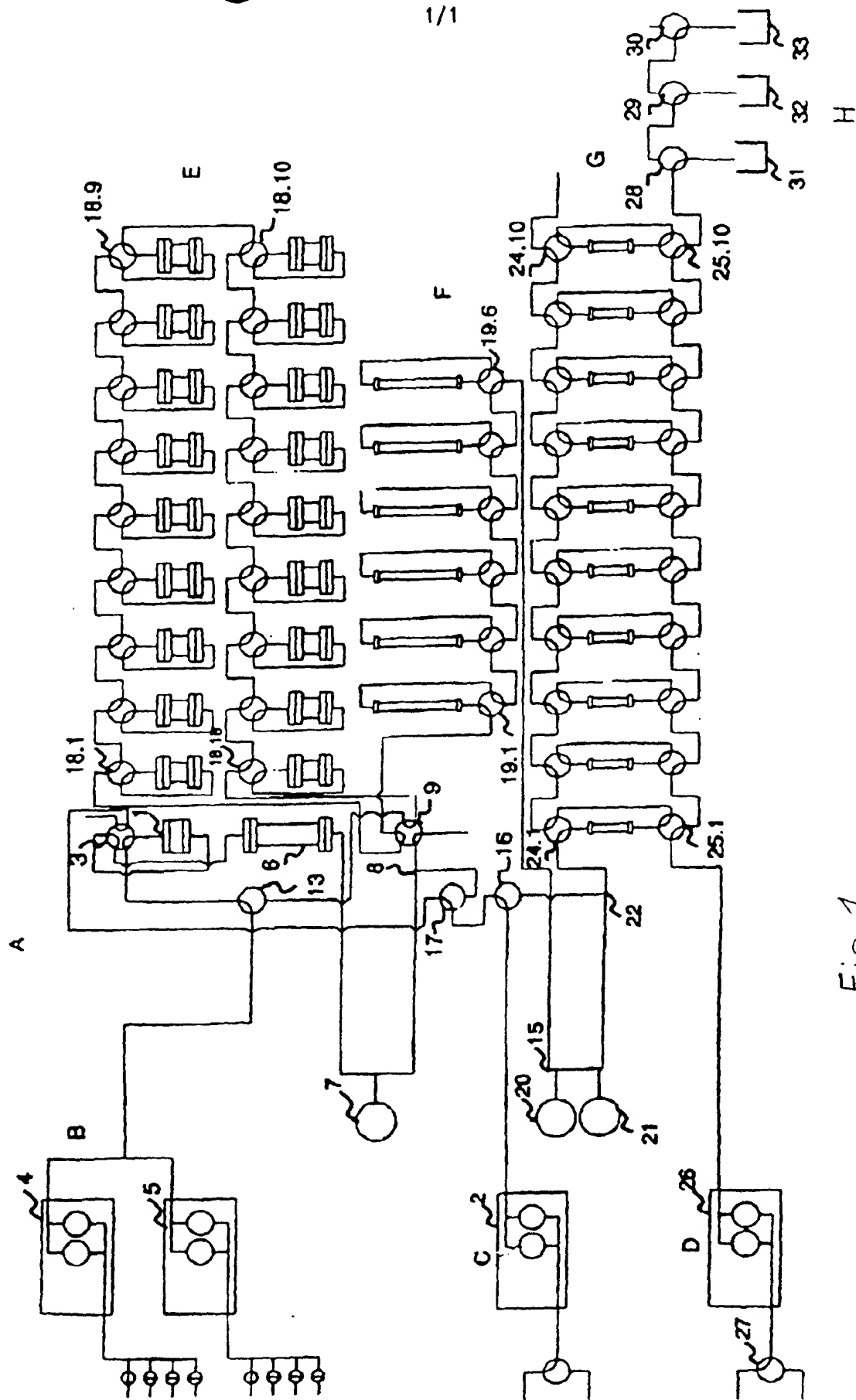


Fig. 1

IN

Internal Application No

PCT/EP 97/05093

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 B01D15/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 B01D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 724 081 A (KAWAHARA) 9 February 1988 see column 4, line 35 - column 8, line 56 ---	1-17,22
A	DE 32 24 495 A (SCHÖNESHÖFER) 29 December 1983 see the whole document ---	1,22
A	US 4 806 250 A (TAKATA) 21 February 1989 see column 6; claims 1-6 ---	1
A	US 4 454 043 A (TING) 12 June 1984 ---	
A	US 5 443 734 A (FETNER) 22 August 1995 see column 14-16; claims 1-12 -----	22,25,26

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

² Special categories of cited documents .

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 January 1998

Date of mailing of the international search report

19/01/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Wendling, J-P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/05093

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4724081 A	09-02-88	NONE	
DE 3224495 A	29-12-83	EP 0103082 A	21-03-84
US 4806250 A	21-02-89	JP 62138753 A	22-06-87
US 4454043 A	12-06-84	NONE	
US 5443734 A	22-08-95	US 5512168 A	30-04-96

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 B01D15/08

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETERecherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 B01D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 4 724 081 A (KAWAHARA) 9. Februar 1988 siehe Spalte 4, Zeile 35 - Spalte 8, Zeile 56 ---	1-17, 22
A	DE 32 24 495 A (SCHÖNESHÖFER) 29. Dezember 1983 siehe das ganze Dokument ---	1, 22
A	US 4 806 250 A (TAKATA) 21. Februar 1989 siehe Spalte 6; Ansprüche 1-6 ---	1
A	US 4 454 043 A (TING) 12. Juni 1984 ---	
A	US 5 443 734 A (FETNER) 22. August 1995 siehe Spalte 14-16; Ansprüche 1-12 -----	22, 25, 26

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. Januar 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

19/01/1998

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Wendling, J-P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05093

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4724081 A	09-02-88	KEINE	
DE 3224495 A	29-12-83	EP 0103082 A	21-03-84
US 4806250 A	21-02-89	JP 62138753 A	22-06-87
US 4454043 A	12-06-84	KEINE	
US 5443734 A	22-08-95	US 5512168 A	30-04-96

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G01N 30/46, B01D 15/08</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/22429</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. April 2000 (20.04.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/07542</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 8. Oktober 1999 (08.10.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 47 439.3 8. Oktober 1998 (08.10.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): AN-ALYTICON AG [DE/DE]; Biotechnologie – Pharmazie, Tegeler Weg 33, D-10589 Berlin (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜLLER-KUHRT, Lutz [DE/DE]; Wublitzweg 12 A, D-14089 Berlin (DE). GUMM, Holger [DE/DE]; Schönbaumer Weg 12, D-13503 Berlin (DE). NOTZKE, Holger [DE/DE]; Strasse 345 Nr. 6, D-13591 Berlin (DE). GOD, Ralf [DE/DE]; Seehofstrasse 52 D-14167 Berlin (DE).</p> <p>(74) Anwälte: GULDE, Klaus, W. usw.; Gulde Hengelhaupt Ziebig, Schützenstrasse 15-17, D-10117 Berlin (DE).</p>		
<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</p>		
<p>(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR THE RAPID LIQUID CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF SUBSTANCE MIXTURES AND FOR THE IDENTIFICATION OF SUBSTANCES</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR SCHNELLEN FLÜSSIGCHROMATOGRAPHISCHEN TRENNUNG VON SUBSTANZGEMISCHEN UND IDENTIFIZIERUNG VON SUBSTANZEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a method and device for the rapid liquid chromatographic separation of substance mixtures and for the identification of substances. The aim of the invention is to provide a device and a method for the liquid chromatographic separation, isolation, and identification of substances in analytic and semipreparative areas, with which a test for determining the activity of substance mixtures is dispensed with. In addition, the inventive method and device carry out the separation of substance mixtures, and the isolation and identification of the individual substances more quickly than prior art methods and devices. To these ends, a method and device are used with which substance mixtures, in a software-controlled rapid liquid chromatographic two-step separation, are subjected to a preliminary separation in a first step and, in the second step, the fractions which were subjected to the preliminary separation and which are deposited in collection columns are parallelly separated into at least two separation lines in a fine manner. The finely separated fractions are parallelly identified and parallelly isolated.</p>		

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Vorrichtung zur schnellen flüssigchromatographischen Trennung von Substanzgemischen und Identifizierung von Substanzen. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur flüssigchromatographischen Trennung, Isolierung und Identifizierung von Substanzen im analytischen und semipräparativen Bereich anzubieten, mit denen sich ein Test auf Wirkung von Substanzgemischen erübrigt und es schneller als bisher möglich ist, Substanzgemische aufzutrennen, die Einzelsubstanzen zu isolieren und zu identifizieren. Die Lösung der Aufgabe erfolgt mit einem Verfahren und einer Vorrichtung, bei denen Substanzgemische in einer softwaregesteuerten schnellen flüssigchromatographischen Zweistufentrennung in der ersten Stufe vorgetrennt und in der zweiten Stufe die vorgetrennten und in Auffangssäulen abgelegten Fraktionen in mindestens zwei Trennlinien parallel fein aufgetrennt, die fein aufgetrennten Fraktionen parallel identifiziert und parallel isoliert werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren und Vorrichtung zur schnellen
flüssigchromatographischen Trennung von
5 Substanzgemischen und Identifizierung von Substanzen

Beschreibung

10 Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Vorrichtung zur schnellen flüssigchromato-graphischen Trennung von Substanzgemischen und Identifizierung von Substanzen gemäß den Oberbegriffen der Ansprüche 1 und 5.

15 Beispielsweise steht in der pharmazeutischen Forschung häufig das Problem aus Substanzgemischen pharmazeutisch aktive Stoffe zu isolieren. So werden Naturstoffextrakte oder auch durch kombinatorische Chemie erzeugte Substanzgemische auf eine mögliche
20 Wirksamkeit getestet. Aus Substanzgemischen die eine Wirksamkeit gezeigt haben, wird dann versucht die wirksamen Substanzen mit Hilfe von aufwendigen Trennverfahren zu isolieren. Danach werden die so isolierten Einzelsubstanzen des Gemisches einem
25 erneuten Wirkungstest unterzogen. Die nun gefundenen wirksamen Einzelsubstanzen werden auf ihre Struktur hin untersucht, um möglicherweise bereits bekannte Wirkstoffe auszuschließen. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, daß bei dem Test der Substanzgemische
30 durch Überlagerungseffekte die Wirksamkeit von Einzelsubstanzen unterdrückt werden kann und diese so unerkannt bleiben. Ein weiterer Nachteil ist, daß durch Überlagerungseffekte eine Wirksamkeit vorgetäuscht werden kann und anschließend

kostenintensiv vergeblich nach diesen vermeintlichen Wirkstoffen im Substanzgemisch gesucht wird. Schließlich erfolgt nachteiligerweise der Ausschluß bereits bekannter Substanzen erst nach der
5 Durchführung von mindestens zwei Tests auf biologische Wirksamkeit und nach aufwendigen Isolationsverfahren, was sehr kostspielig ist. Zur Durchführung dieser Tests sind in der Regel große Substanzmengen nötig, d. h., daß Trennungen im
10 präparativen Maßstab zu erfolgen haben. Präparative Anlagen sind aber von den Investitionskosten her teurer als analytische Anlagen. Ebenso verbrauchen präparative Anlagen zur Trennung erheblich mehr Lösungsmittel und Puffersubstanzen, was ihren Betrieb
15 teuer macht und zusätzlich größere Entsorgungsprobleme und Umweltbelastungen hervorruft.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur flüssig-
20 chromatographischen Trennung, Isolierung und Identifizierung von Substanzen im analytischen und semipräparativen Bereich anzubieten, mit denen sich ein Test auf Wirkung von Substanzgemischen erübrigt und es schneller als bisher möglich ist
25 Substanzgemische aufzutrennen, die Einzelsubstanzen zu isolieren und zu identifizieren.

Die Lösung der Aufgabe erfolgt mit den kennzeichnenden Teilen der Ansprüche 1 und 5.

30 Vorteilhafte Weiterbildungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

Die Erfindung weist verschiedene Vorteile auf. Die Substanzen müssen nicht mehr doppelt, nämlich vorher im Substanzgemisch und nach der Isolierung getestet werden. Erfindungsgemäß kann der aufwendige und kostspielige und zum Teil fehlerbehaftete erste Wirkungstest der Substanzgemische entfallen. Statt dessen werden nach der kombinierten Isolierung und Identifikation nur potentiell neue Wirksubstanzen weiteren Tests unterzogen. Die bisher übliche kostspielige Bearbeitung bereits bekannter Substanzen entfällt. Der Zeit- und Kostenaufwand für die Ermittlung einer neuen Wirksubstanz kann erheblich reduziert werden. Zusätzlich ist diese Verfahrensweise sicherer, denn die Testergebnisse an unbekannten Einzelsubstanzen sind eindeutig und alle im Gemisch vorhandenen Wirksubstanzen werden auch erfaßt.

Die zu untersuchenden Substanzgemische werden in einer zweistufigen Trennung bearbeitet, dabei können durch die erfindungsgemäße Verschaltung von Trennsäulen und Festphasenextraktionssäulen (Auffangsäulen) mit der Pumpeneinheit in der zweiten chromatographischen Trennstufe mehrere Fraktionen aus dem ersten Trennungsschritt parallel getrennt werden. Somit arbeitet diese Vorrichtung erheblich schneller und damit kostengünstiger als bekannte zweistufige Vorrichtungen.

Die Identifikation der Einzelsubstanzen erfolgt durch an sich bekannten direkten computergesteuerten Vergleich der von Detektoren gewonnenen Chromatogrammen und Spektren sowie des Retentionsbereiches aus dem ersten Trennschritt und der

Retentionszeit aus dem zweiten Trennschritt mit Informationen über bekannte Substanzen in einer Datenbank. Als Detektions- und Identifikationsprinzipien sind Ultraviolett-Absorption, Massenspektrometrie, Lichtstreuung, Fluoreszenz, Infrarotspektroskopie und Kernspinresonanzspektroskopie möglich. Die Einbeziehung weiterer Identifizierungsparameter wie z. B. Quelle und Herkunft der Probe ist möglich. Da weniger Tests zur Identifizierung der Substanzen im Gemisch und zum Ausschluß bereits bekannter Substanzen notwendig sind, kann diese Anlage im analytischen und semipräparativen Maßstab dimensioniert sein. Analytische und semipräparative Anlagen sind in der Anschaffung und im Betrieb wesentlich kostengünstiger als die bisher üblichen präparativen Anlagen. Durch den geringeren Lösungsmittel- und Puffersubstanzenverbrauch ist das erfindungsgemäße Verfahren und die Vorrichtung aufgrund geringerer Abfallmengen umweltfreundlich.

Die Erfindung wird anhand einer Zeichnung und eines Ausführungsbeispiels näher erläutert.

Es zeigen

Fig. 1 eine schematische Darstellung des Ablaufes des Equilibrierens im ersten Trennschritt und Spülen der Aufgabesäulenbatterie,

Fig. 2 eine schematische Darstellung des Auftrennens eines Substanzgemisches im ersten Trennschritt und Adsorption von Fraktionen an der ersten Auffangsäulenbatterie,

Fig. 3 eine schematische Darstellung des Auftrennens eines Substanzgemisches im ersten Trennschritt und Adsorption von Fraktionen an der zweiten Auffangssäulenbatterie,

Fig. 4 eine schematische Darstellung des Auftrennens eines Substanzgemisches im ersten Trennschritt und Adsorption von Fraktionen an der dritten Auffangssäulenbatterie,

Fig. 5 eine schematische Darstellung der Equilibrierung der Trennsäulenbatterien des zweiten Trennschrittes,

Fig. 6 eine schematische Darstellung einer parallelen Trennung absorbierter Fraktionen im zweiten Trennschritt und

Fig. 7 eine schematische Darstellung des Equilibrierens einer Auffangssäulenbatterie.

Fig. 1 bis Fig. 7 zeigen beispielhaft den Aufbau und das Ablaufschema einer erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einer Trennsäule und drei nachgeordneten Trennlinien.

Eine Pumpeneinheit 2, die aus drei Pumpen 2.1 bis 2.3 besteht, ist über die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.1 und 3.3 sowie dem 3-Wege-2-Positions-Ventil 5.7 mit einer Aufgabesäulenbatterie 6, einer Trennsäule 10, für die erste Trennungsstufe und einer zweiten Trennstufe, die aus drei parallel betreibbaren Trennlinien besteht, denen jeweils ein 6-Wege-2-Positions-Ventil 3.5, 3.6 und 3.7 vorgeordnet ist,

verbunden. Damit ist es möglich, die mobile Phase in jeder gewünschten Zusammensetzung nacheinander und parallel in alle Bereiche der Vorrichtung zu transportieren.

5

Jede Trennlinie weist eine Auffangssäulenbatterie 7, 8 und 9 und eine Trennsäulenbatterie 11, 12 und 13 auf. Beispielfhaft enthält die Auffangssäulenbatterie 7 die Auffangssäulen 7.1 bis 7.6 und die Trennsäulenbatterie 10 11 die Trennsäulen 11.1 und 11.2. Die beiden weiteren dargestellten Trennlinien sind identisch aufgebaut. Andere Varianten mit mehr Aufgabesäulen 6.1 bis 6.6 der Aufgabesäulenbatterie 6, mehrerer Trennsäulen 10, mehr als drei Auffangssäulenbatterien 7, 8 und 9 mit 15 jeweils mehr als sechs Auffangssäulen und mehr als drei Trennsäulenbatterien 11, 12 und 13 mit mehr als sechs Trennsäulen pro Batterie sind möglich.

Im folgenden wird der Ablauf des erfindungsgemäßen Verfahrens beispielhaft beschrieben. Substanzgemischproben werden jeweils in einem Lösungsmittel gelöst und mit einem Adsorbenten versetzt. Anschließend wird das Lösungsmittel mittels eines Rotationsverdampfers entfernt, damit die mit 25 Probenmaterial belegten Adsorbenten rieselfähige Eigenschaften erreichen. Die mit dem Substanzgemisch belegten Adsorbenten werden in die Aufgabesäulen 6.1 bis 6.6 der Aufgabesäulenbatterie 6 verfüllt und in die Aufgabesäulenbatterie 6 eingebaut. Die nun 30 folgenden Programmablaufschritte werden über eine Software gesteuert.

Gemäß Fig. 1 wird die Trennsäule 10 equilibriert. Parallel dazu wird die Luft aus der

Aufgabesäulenbatterie 6 entfernt. Über die Pumpe 2.3, das 3-Wege-2-Positions-Ventil 5.7 und über die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.1 und 3.3 wird mit Wasser die Luft aus einer der trocken verfüllten Aufgabesäulen 6.1 bis 6.6 entfernt, die als nächstes injiziert werden soll. Gleichzeitig wird über die Pumpe 2.1, die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.1 und 3.3 die Trennsäule 10 mit einem geeigneten Laufmittel equilibriert.

In Fig. 2 ist das Auftrennen des Substanzgemisches in der ersten Trennstufe an der Trennsäule 10 und die anschließende Adsorption der Fraktionen in einer Trennlinie mit den Auffangssäulen 7.1 bis 7.6 der Auffangssäulenbatterie 7 dargestellt.

Wenn die Luft aus einer der Aufgabesäulen 6.1 bis 6.6 entfernt ist, wird das Trennprogramm gestartet. Zunächst werden die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.3 und 3.5 geschaltet. Über eine Niederdruckventileinheit 1 mit den Niederdruckventilen 1.1 bis 1.3 können die Bestandteile der mobilen Phase mittels der Pumpeneinheit 2 in das System eingegeben werden. Über das Niederdruckventil 1.1 der Pumpe 2.1 und die Pumpe 2.1 wird mobile Phase transportiert, wobei dieses System sowohl isokratisch als auch mit einem Gradienten gefahren werden kann. Über das 6-Wege-2-Positions-Ventil 3.3 und die 7-Wege-6-Positions-Ventile 4.1/4.2 wird die mobile Phase von Pumpe 2.1 auf diejenige Aufgabesäule 6.1 bis 6.6 geführt, von der Probenmaterial bearbeitet werden soll. Von einer der Aufgabesäulen 6.1 bis 6.6 wird die zu trennende Probe auf die Trennsäule 10 überführt. Die aus der Trennsäule 10 austretenden

getrennten Probekomponenten gelangen über ein 6-Wege-2-Positions-Ventil 3.4 und den Detektor 14.1 zu einem T-Stück 17, wo über die Pumpe 2.2 und das 6-Wege-2-Positions-Ventil 3.1 Wasser der mobilen Phase zugemischt wird. Die Menge des zugemischten Wassers richtet sich dabei nach der Polarität der zu trennenden Substanzen. Die durch Wasser erhöhte Polarität der mobilen Phase ermöglicht nun die Adsorption auf den Auffangssäulen 7.1 bis 7.6 der Auffangssäulenbatterie 7. Über das 6-Wege-2-Positions-Ventil 3.5 wird zunächst auf die Auffangssäulenbatterie 7 adsorbiert. Dabei werden nacheinander die Auffangssäulen 7.1 bis 7.6 mit Fraktionen belegt.

In Fig. 3 ist die Adsorption weiterer Fraktionen an den Auffangssäulen 8.1 bis 8.6 der Auffangssäulenbatterie 8 dargestellt. Wenn alle Auffangssäulen der Auffangssäulenbatterie 7 mit Fraktionen belegt sind, schalten die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.5 und 3.6 die Auffangssäulenbatterie 8 in den Eluentenstrom. Nun werden nacheinander die Auffangssäulen 8.1 bis 8.6 mit Fraktionen belegt.

In Fig. 4 ist die Adsorption von Fraktionen an die Auffangssäulen 9.1 bis 9.6 der Auffangssäulenbatterie 9 dargestellt. Wenn alle Auffangssäulen 8.1 bis 8.6 der Auffangssäulenbatterie 8 mit Fraktionen belegt sind, schalten die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.6 und 3.7 die Auffangssäulenbatterie 9 in den Eluentenstrom. Nun werden nacheinander die Auffangssäulen 9.1 bis 9.6 mit Fraktionen belegt. In dem folgenden Ablaufschritt werden parallel die an den drei Auffangssäulenbatterien 7, 8 und 9 adsorbierten Fraktionen

eluiert und auf entsprechend zugeordnete Trennsäulenbatterien 11, 12 und 13 weiter aufgetrennt.

5 Vor jeder Trennung werden die Trennsäulenbatterien 11, 12 und 13 equilibriert. In Fig. 5 ist die Equilibrierung der Trennsäulenbatterien 11, 12 und 13 dargestellt. Zur Equilibrierung wird mobile Phase
10 über die Pumpe 2.1 das 6-Wege-2-Positions-Ventil 3.1 und 3.5 auf die Trennsäulen 11.1 bzw. 11.2 der Trennsäulenbatterie 11 geführt. Von dort wird die mobile Phase über das 6-Wege-2-Positions-Ventil 3.4 den Detektor 14.1 und einem Fraktionssammler 15.1 in den Abfall geführt. Parallel dazu werden die
15 Trennsäulen 12.1 und 12.2 der Trennsäulenbatterie über die Pumpe 2.2 die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.1 und 3.6 sowie einen Detektor 14.2 und Fraktionssammler 15.2 equilibriert. Ebenso werden dazu parallel die Trennsäulen 13.1 und 13.2 über die
20 Pumpe 2.3 das 6-Wege-2-Positions-Ventil 3.7 und das 3-Wege-2-Positions-Ventil 5.7 sowie einen Detektor 14.3 und einen Fraktionssammler 15.3 equilibriert.

In Fig.6 ist die parallele Trennung der an den
25 Auffangsäulenbatterien 7, 8 und 9 adsorbierten Fraktionen auf den Trennsäulenbatterien 11, 12 und 13 dargestellt. Zur Einleitung des Trennschrittes wird mobile Phase über die Pumpe 2.1 der Pumpeneinheit 2 und die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.1 und 3.5 auf
30 die Auffangsäulenbatterie 7 geführt. Die erste eluierte Fraktion aus der Auffangsäulenbatterie 7 (z. B. von Auffangsäule 7.1) wird über das 6-Wege-2-Positions-Ventil 3.5 zur Trennsäulenbatterie 11 geleitet. Dort kann wahlweise softwaregesteuert eine

der Trennsäulen 11.1 oder 11.2 zugeschaltet werden. Die getrennten Komponenten werden dann anschließend über die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.5 und 3.4 zum Detektor 14.1 geführt. Die Software in der elektronischen Steuereinheit wertet die Signale mit Hilfe von Peakerkennung aus und lenkt die getrennten Komponenten in die entsprechenden Vials des Fraktionssammlers 15.1. Gleichzeitig ist auch eine Zeitsteuerung des Fraktionssammlers 15.1 möglich. Diese Zeitsteuerung kann automatisch aktiviert werden, wenn kein Peak den Detektor passiert.

Parallel dazu wird mobile Phase über die Pumpe 2.2 und die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.1 und 3.6 zur Auffangsäulenbatterie 8 gefördert. Die erste eluierte Fraktion aus der Auffangsäulenbatterie 8 (z. B. von der Auffangsäule 8.1) wird über das 6-Wege-2-Positions-Ventil 3.6 zur Trennsäulenbatterie 12 geleitet. Dort kann wahlweise softwaregesteuert eine der Trennsäulen 12.1 oder 12.2 zugeschaltet werden. Die getrennten Komponenten werden zum Detektor 14.2 geführt. Die Software wertet auch hier die Signale mit Hilfe von Peakerkennung aus und lenkt dann die getrennten Komponenten in die entsprechenden Vials des Fraktionssammlers 15.2. Auch dieser Fraktionssammler 15.2 kann zeitgesteuert werden. Diese Zeitsteuerung kann automatisch aktiviert werden, wenn kein Peak den Detektor passiert.

Parallel zu den Abläufen in zwei Trennlinien wird die dritte Trennlinie hinsichtlich der Einleitung des Trennungsschrittes aktiviert. Dazu wird die mobile Phase über Pumpe 2.3 sowie das 3-Wege-2-Positions-Ventil 5.7 und das 6-Wege-2-Positions-Ventil 3.7 zur

Auffangsäulenbatterie 9 gefördert. Die erste eluierte Fraktion aus der Auffangsäulenbatterie 9 (z. B. von der Auffangsäule 9.1) wird über das Ventil 3.7 zur Trennsäulenbatterie 13 geleitet. Dort kann wahlweise softwaregesteuert eine der Trennsäulen 13.1 oder 13.2 zugeschaltet werden. Die getrennten Komponenten werden zum Detektor 14.3 geführt. Die Steuerung des sich anschließenden Fraktionssammlers 15.3 erfolgt wie bereits beschrieben. Nachdem die jeweils ersten Fraktionen parallel bearbeitet worden sind, erfolgt zur Vorbereitung und der Trennung der nächsten Fraktionen erneut Equilibrierung der Trennsäulenbatterien 11, 12 und 13 (vgl. Fig. 5). Anschließend schalten die 7-Wege-6-Positions-Ventile 4.3/4.4, 4.5/4.6 und 4.7/4.8 an den Auffangsäulenbatterien 7, 8 und 9 weiter, so daß nun die zweiten Fraktionen bearbeitet werden können, wie in Fig. 6 dargestellt. Diese Vorgänge setzen sich solange fort bis alle Fraktionen bearbeitet worden sind.

Fig. 7 stellt das Equilibrieren der Auffangsäulen 7.1 bis 7.6 der Auffangsäulenbatterie 7 dar. In diesem Programmablaufschritt werden die Auffangsäulen 7.1 bis 7.6 mit Wasser gespült und so für den nächsten Lauf vorbereitet. Dies erfolgt sequentiell über die Pumpe 2.2, die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.1, 3.5, 3.6, 3.7 sowie die 7-Wege-6-Positions-Ventile 4.3/4.4 der Auffangsäulenbatterie 7. Das Equilibrieren der Auffangsäulenbatterien 8 und 9 erfolgt analog. Die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.5 und 3.6 werden geschaltet und über die Pumpe 2.2 die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.1, 3.5, 3.6, 3.7 sowie die 7-Wege-6-Positionsventile 4.5/4.6 der Auffang-

säulenbatterie 8 erfolgt das Equilibrieren der Auffangssäulen 8.1 bis 8.6. Anschließend werden die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.6 und 3.7 geschaltet und über die Pumpe 2.2 die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.1, 3.5, 3.6, 3.7 sowie die 7-Wege-6-Positionsventile 4.7/4.8 der Auffangssäulenbatterie 9 erfolgt das Equilibrieren der Auffangssäulen 9.1 bis 9.6. Nach diesem Programmablauf werden die 7-Wege-6-Positions-Ventile 4.1/4.2 der Aufgabebatterie 6 auf die nächste Aufgabesäule (z. B. 6.2) geschaltet und der gesamte Programmablauf beginnt von vorn. (Ablaufschritt 1: Equilibrieren der Trennsäule 10 und Entlüften der Aufgabesäule 6.2, dargestellt in Fig. 1 usw.)

Nach Bearbeitung dieser zweiten Probe kann die folgende Aufgabesäule 6.3 in den Eluentenstrom geschaltet werden. Da bereits abgearbeitete Probeaufgabesäulen jederzeit durch neue ersetzt werden können, ist ein kontinuierlicher Betrieb mit einer unbegrenzten Anzahl von Proben möglich.

Während des ersten und zweiten Trennschrittes werden über die Detektoren 14.1, 14.2 und 14.3 Chromatogramme, Retentionsdaten und Spektren gesammelt, direkt in einem Rechner verarbeitet und mit den Daten bekannter Substanzen verglichen. Somit lassen sich bereits online bekannte Substanzen identifizieren und aussortieren. Im Zweifelsfall können noch weitere Daten, die offline nach Trennung und Isolierung gewonnen werden, zur Identifikation herangezogen werden.

Bezugszeichenliste

5	1	Niederdruckventileinheit
	1.1	Niederdruckventil
	1.2	Niederdruckventil
	1.3	Niederdruckventil
10	2	Pumpeneinheit
	2.1	Pumpe
	2.2	Pumpe
	2.3	Pumpe
	3	6-Wege-2-Positions-Ventil
15	3.1	6-Wege-2-Positions-Ventil
	3.3	6-Wege-2-Positions-Ventil
	3.4	6-Wege-2-Positions-Ventil
	3.5	6-Wege-2-Positions-Ventil
	3.6	6-Wege-2-Positions-Ventil
20	3.7	6-Wege-2-Positions-Ventil
	4	7-Wege-6-Positions-Ventil
	4.1	7-Wege-6-Positions-Ventil
	4.2	7-Wege-6-Positions-Ventil
	4.3	7-Wege-6-Positions-Ventil
25	4.4	7-Wege-6-Positions-Ventil
	4.5	7-Wege-6-Positions-Ventil
	4.6	7-Wege-6-Positions-Ventil
	4.7	7-Wege-6-Positions-Ventil
	4.8	7-Wege-6-Positions-Ventil

	5	3-Wege-2-Positions-Ventil
	5.1	3-Wege-2-Positions-Ventil
	5.2	3-Wege-2-Positions-Ventil
	5.3	3-Wege-2-Positions-Ventil
5	5.4	3-Wege-2-Positions-Ventil
	5.5	3-Wege-2-Positions-Ventil
	5.6	3-Wege-2-Positions-Ventil
	5.7	3-Wege-2-Positions-Ventil
	6	Aufgabesäulenbatterie
10	5.1	Aufgabesäule
	5.2	Aufgabesäule
	5.3	Aufgabesäule
	5.4	Aufgabesäule
	5.5	Aufgabesäule
15	5.6	Aufgabesäule
	7	Auffangsäulenbatterie
	7.1	Auffangsäule
	7.2	Auffangsäule
	7.3	Auffangsäule
20	7.4	Auffangsäule
	7.5	Auffangsäule
	7.6	Auffangsäule
	8	Auffangsäulenbatterie
	8.1	Auffangsäule
25	8.2	Auffangsäule
	8.3	Auffangsäule
	8.4	Auffangsäule
	8.5	Auffangsäule
	8.6	Auffangsäule
30	9	Auffangsäulenbatterie
	9.1	Auffangsäulen
	9.1	Auffangsäulen
	9.2	Auffangsäulen
	9.3	Auffangsäulen
35	9.4	Auffangsäulen

	9.5	Auffangssäulen
	9.6	Auffangssäulen
	10	Trennsäule
	11	Trennsäulenbatterie
5	11.1	Trennsäule
	11.2	Trennsäule
	12	Trennsäulenbatterie
	12.1	Trennsäule
	12.2	Trennsäule
10	13	Trennsäulenbatterie
	13.1	Trennsäule
	13.2	Trennsäule
	14	Detektoren
	14.1	Detektor
15	14.2	Detektor
	14.3	Detektor
	15	Fraktionssammler
	15.1	Fraktionssammler
	15.2	Fraktionssammler
20	15.3	Fraktionssammler
	16	Abfall
	16.1	Abfall
	16.2	Abfall
	17	T-Stück
25		
30		
35		

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur schnellen flüssig-
chromatographischen Trennung und Identifizierung
von Substanzen
dadurch gekennzeichnet, daß
10 Substanzgemische in einer softwaregesteuerten
schnellen flüssigchromatographischen Zweistufen-
trennung in der ersten Stufe vorgetrennt und in
der zweiten Stufe die vorgetrennten und in
Auffangssäulen abgelegten Fraktionen in mindestens
15 zwei Trennlinien parallel fein aufgetrennt, die
fein aufgetrennten Fraktionen parallel
identifiziert und parallel isoliert werden.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
in der ersten Trennstufe die Vortrennung von
Substanzgemischen nacheinander und in der zweiten
Stufe die Feintrennung nacheinander und/oder
25 parallel erfolgt.
- 30 3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, daß
mindestens ein Detektor (14.1) sowohl nach der
ersten Trennstufe als auch nach der zweiten
Trennstufe genutzt wird.
- 35 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, daß
die in den Trennlinien aufgetrennten und
isolierten Substanzen einer weiteren Reinigungs-
prozedur insbesondere einer adsorptiven Reinigung
unterzogen werden.

5. Vorrichtung zur schnellen flüssigchromatischen Trennung und Identifikation von Substanzen bestehend aus mehreren Trenn- und Auffangssäulen sowie Aufgabesystemen Detektoren- und Fraktionssammler, deren Zusammenwirken über eine zentrale Steuereinheit steuerbar ist, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer Trennsäule (10) mehrere parallele flüssigchromatographische Trennlinien, bestehend aus je einer Kombination von Trennsäulenbatterien (11, 12, 13) mit Auffangssäulenbatterien (7, 8, 9), Detektoreinheiten (14) und Fraktioniersammlereinheiten (15), nachgeordnet sind, daß eine Pumpeneinheit (2) bestehend aus drei Pumpen (2.1, 2.2, 2.3) zur Förderung der mobilen Phase sowohl mit der Trennsäule (10) als auch mit den Trennlinien funktionell verbunden ist und daß softwaremäßig schaltbare Mehrwegeventile zwischen den einzelnen Funktionseinheiten angeordnet sind.
6. Vorrichtung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß vor jeder Trennlinie je ein Mehrwegeventil (3.5, 3.6, 3.7) angeordnet ist.
7. Vorrichtung nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß den Trennlinien nachgeschaltet weitere Auffangssäulen angeordnet sind.

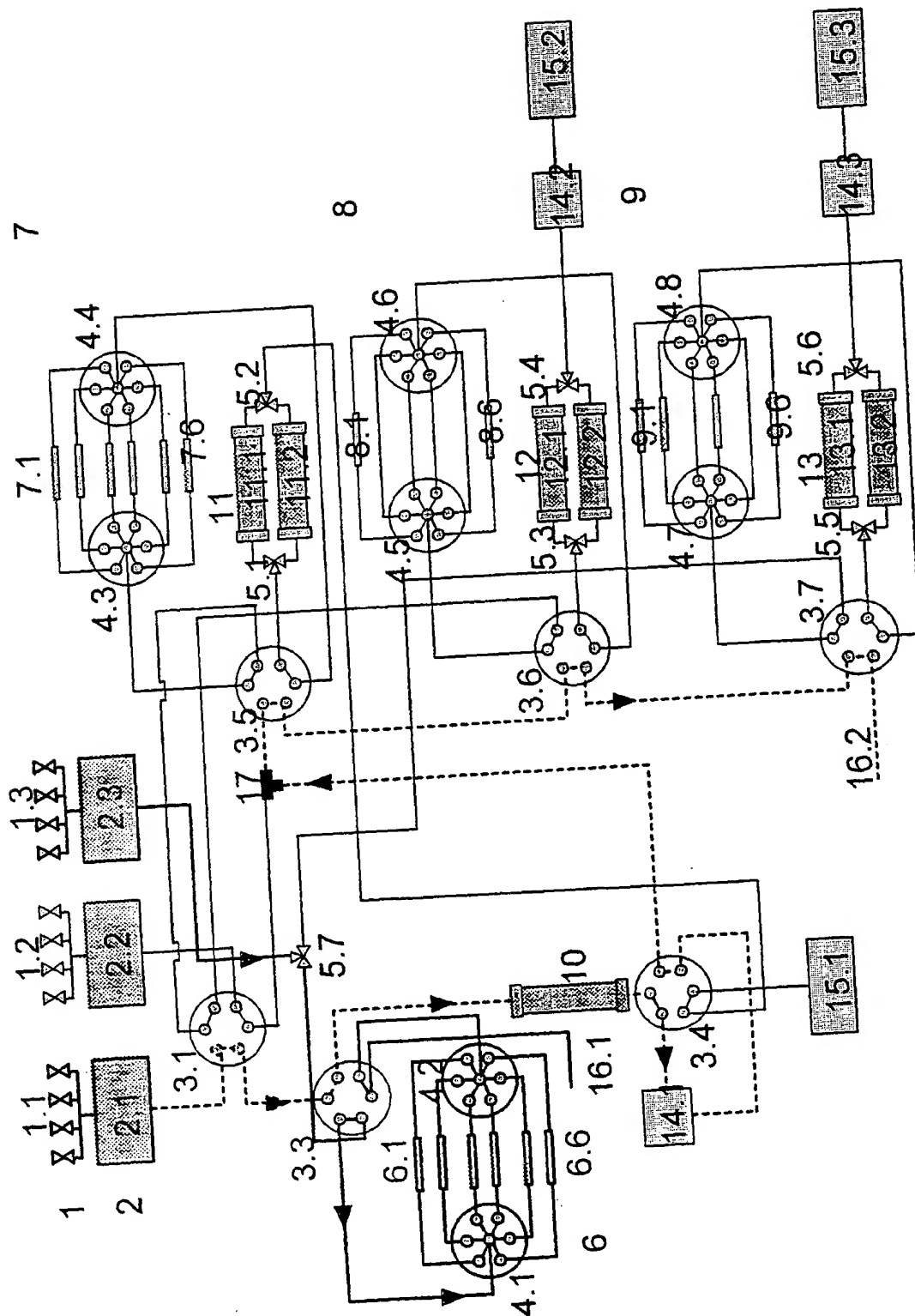


FIG. 1

2/7

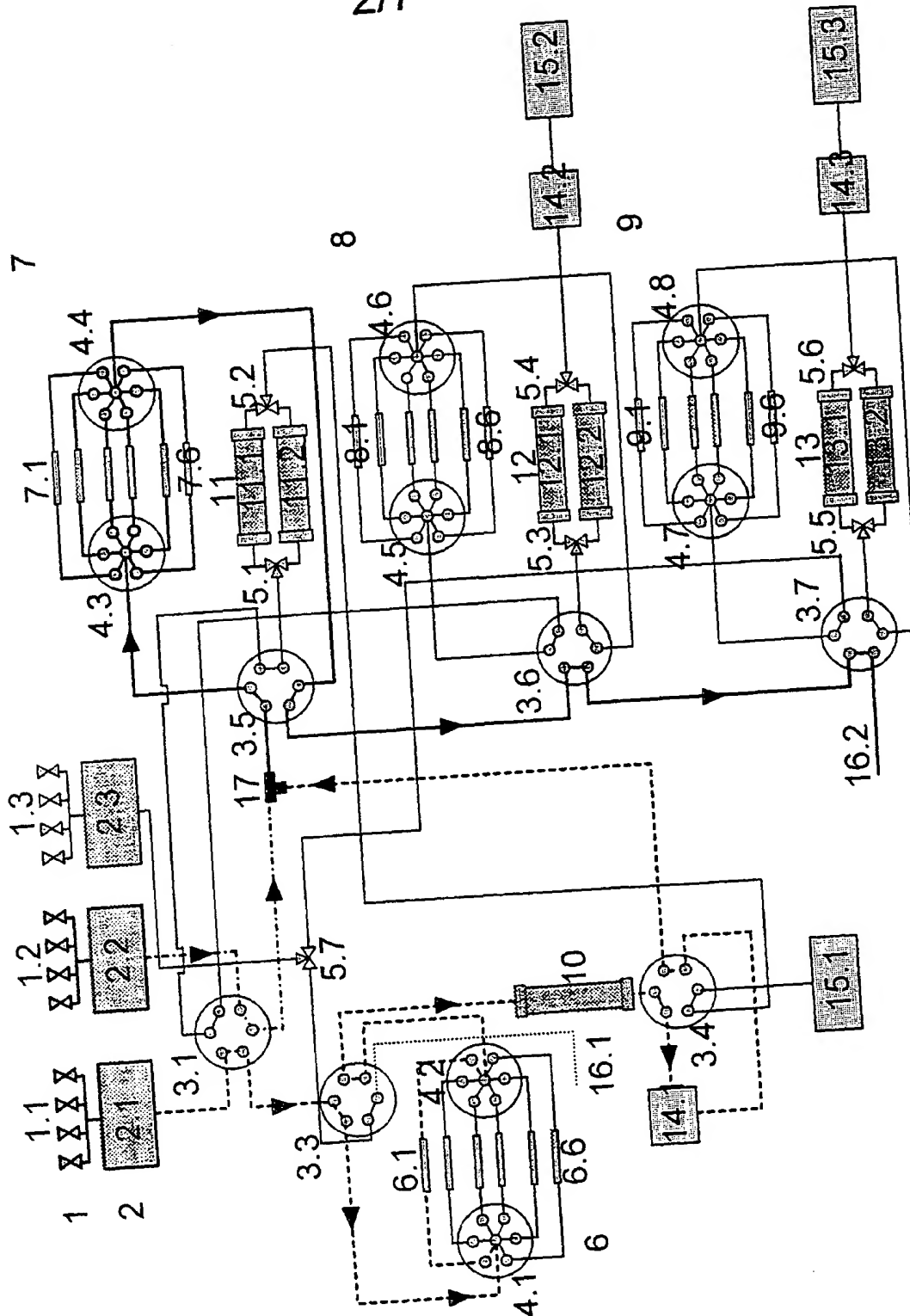


FIG. 2

3/7

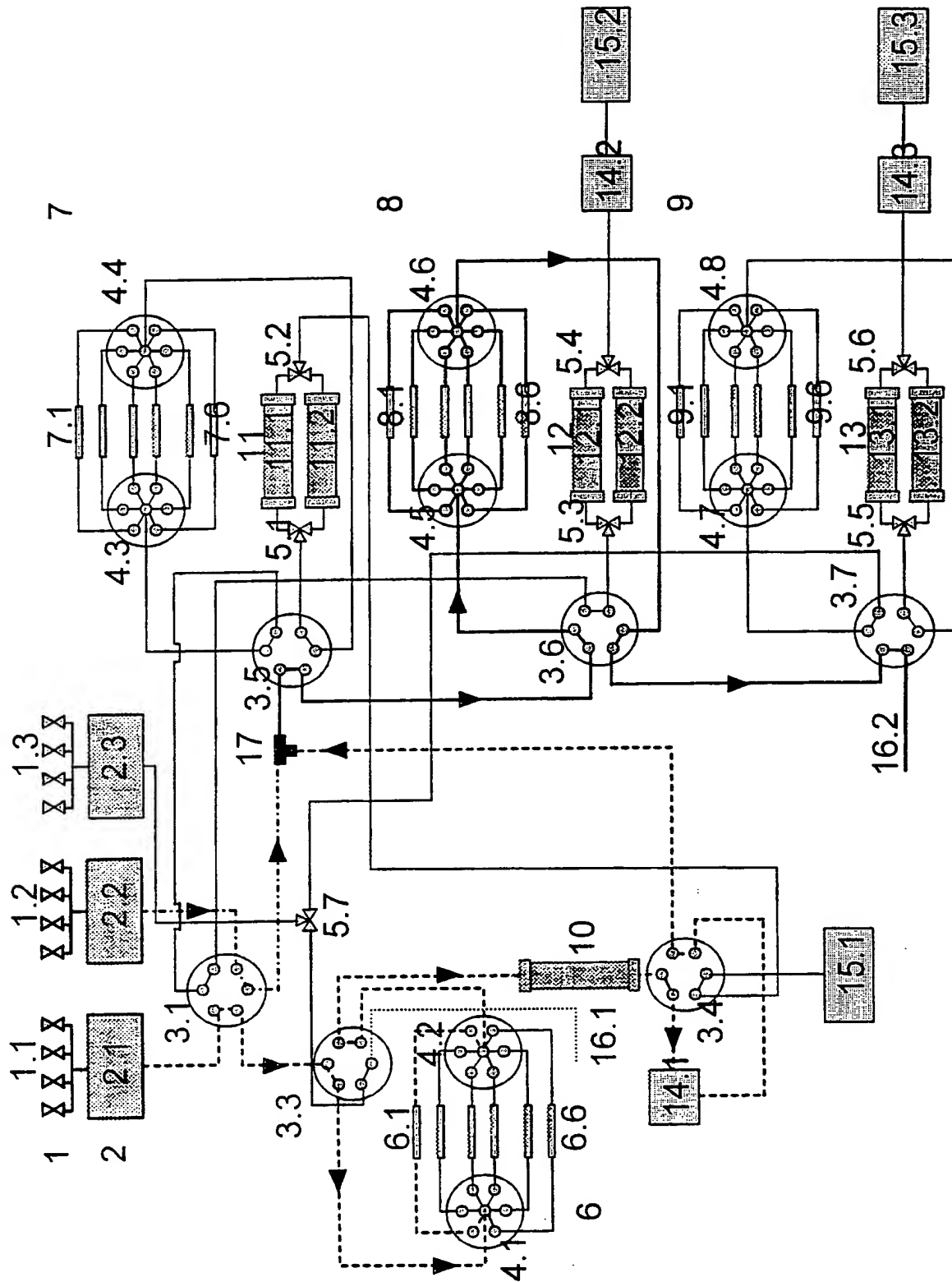


FIG. 3

4/7

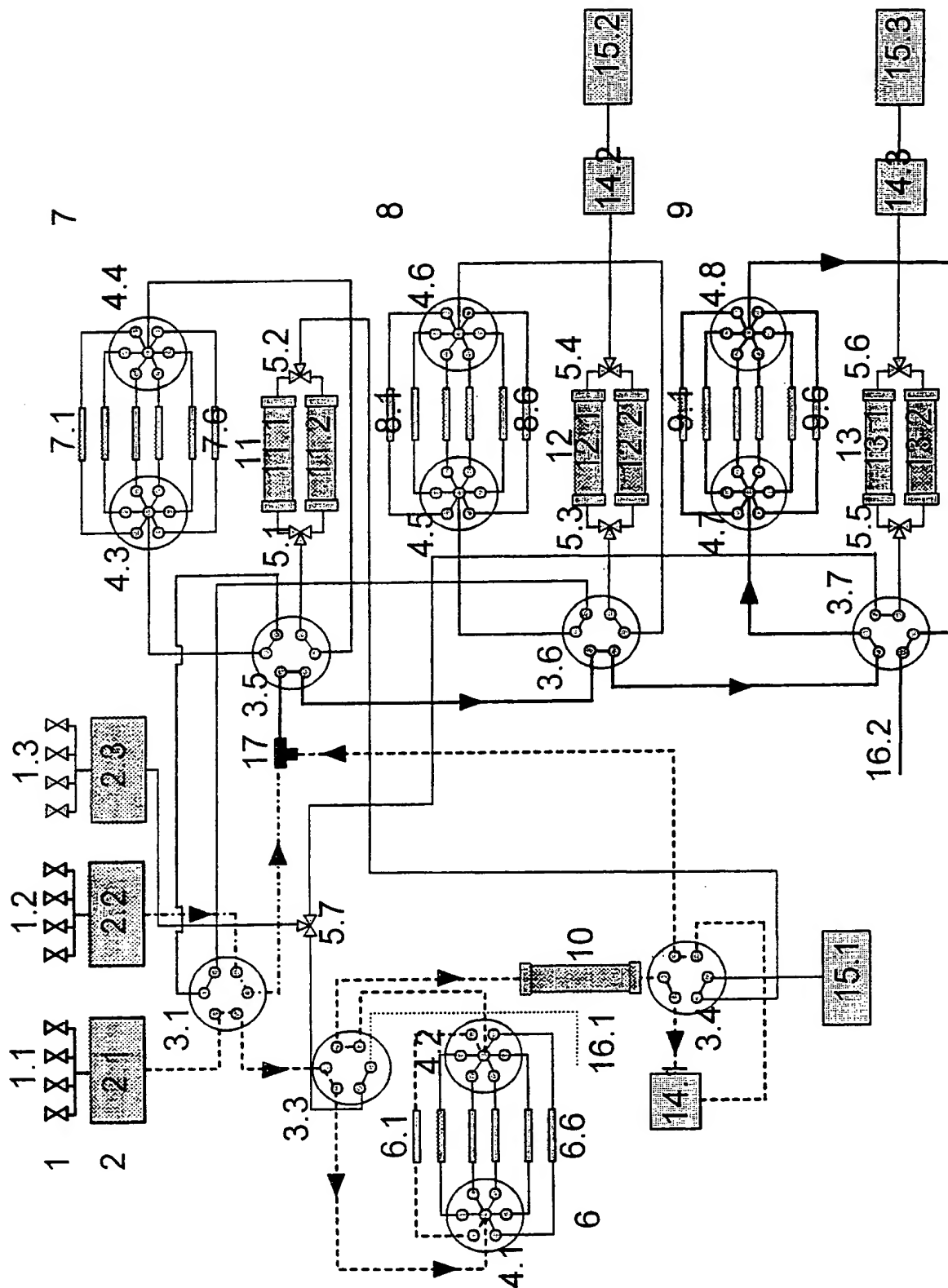


FIG. 4

5/7

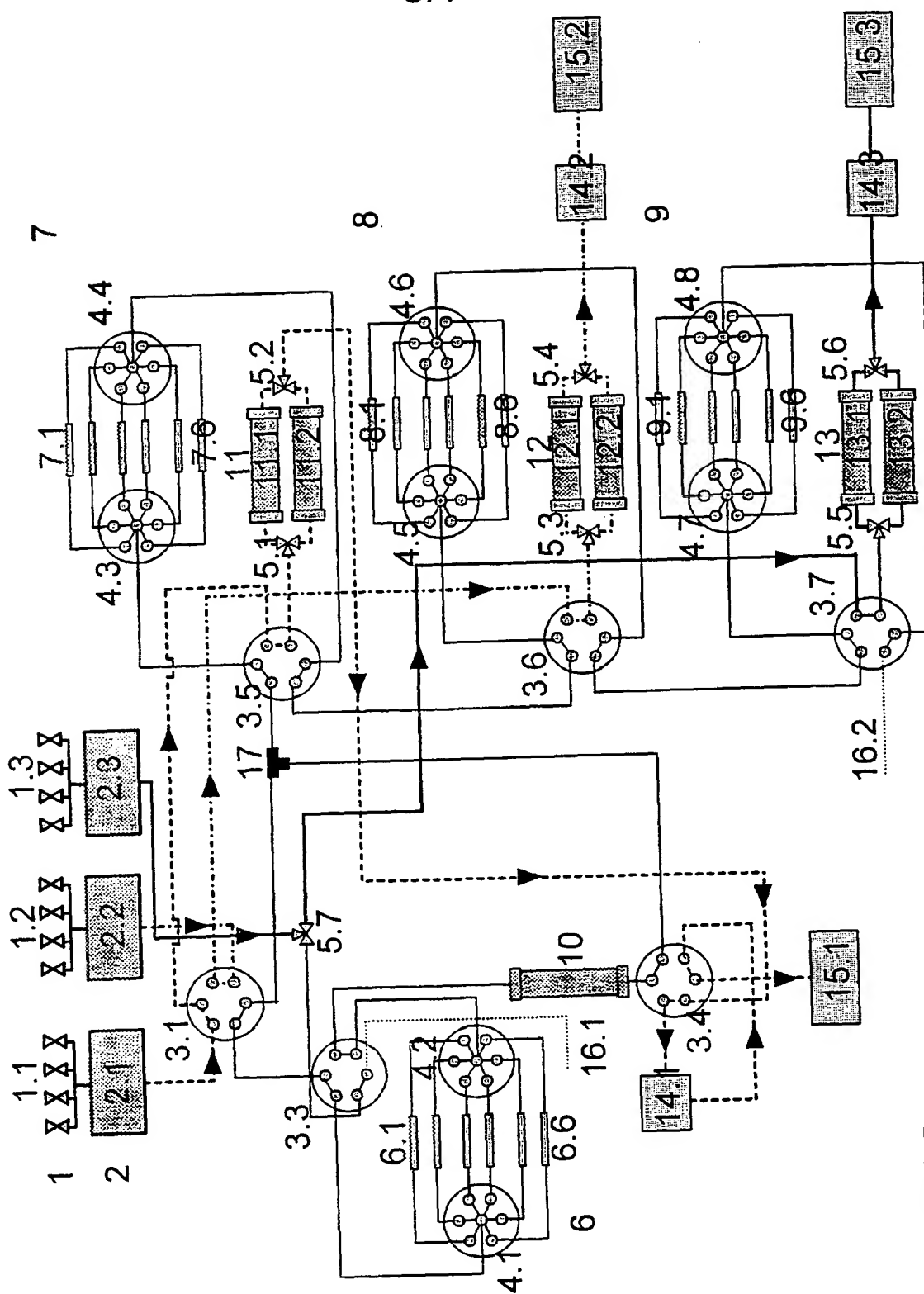


FIG. 5

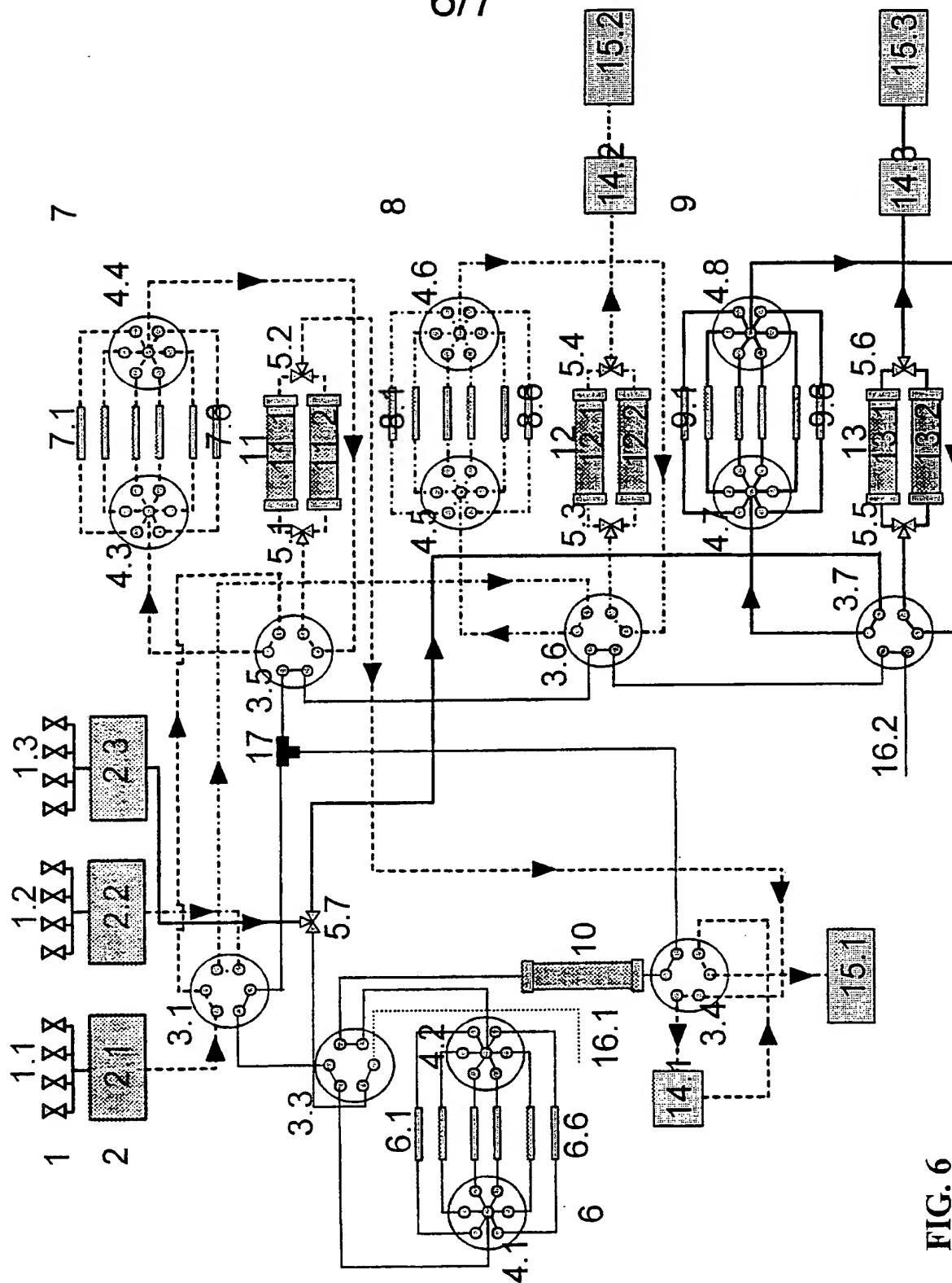


FIG. 6



7/7

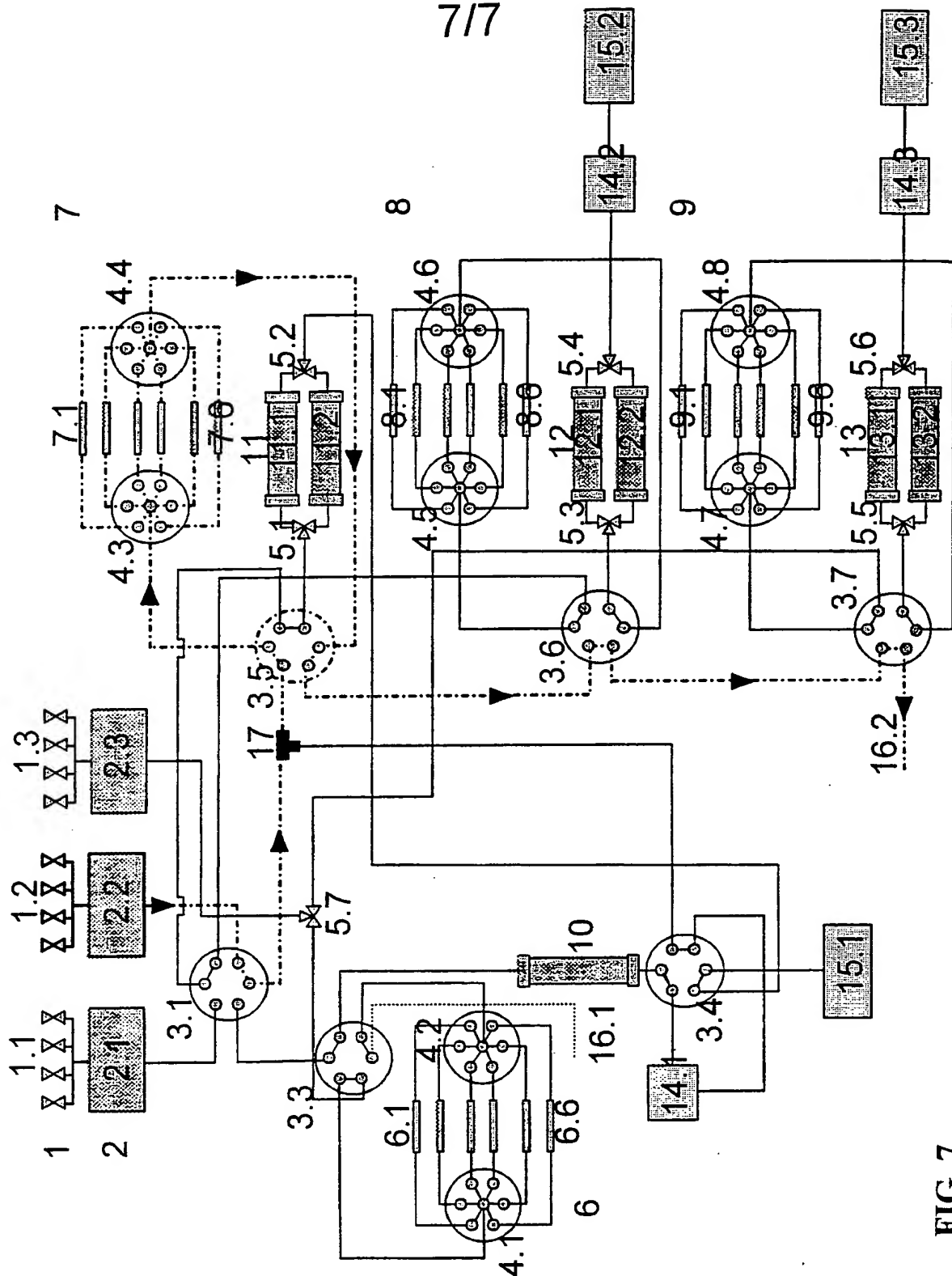


FIG. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/07542

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N30/46 B01D15/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N B01D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 13118 A (GUMM HOLGER ;ANALYTICON AG BIOTECHNOLOGIE P (DE); MUELLER KUHRT LU) 2 April 1998 (1998-04-02) figure 1 ---	1-7
X	US 5 198 115 A (STALLING DAVID L ET AL) 30 March 1993 (1993-03-30) column 1, line 7-21 column 14, line 14 -column 17, line 23 ---	1-7
A	US 5 670 054 A (KIBBEY CHRISTOPHER EDMUND ET AL) 23 September 1997 (1997-09-23) the whole document -----	1,5

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 January 2000

Date of mailing of the international search report

07/02/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Müller, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/07542

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9813118	A	02-04-1998	DE 19641210 A DE 29617376 U EP 0946236 A	02-04-1998 21-11-1996 06-10-1999
US 5198115	A	30-03-1993	NONE	
US 5670054	A	23-09-1997	AU 2601597 A WO 9738303 A	29-10-1997 16-10-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07542

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N30/46 B01D15/08		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N B01D		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 13118 A (GUMM HOLGER ; ANALYTICON AG BIOTECHNOLOGIE P (DE); MUELLER KUHRT LU) 2. April 1998 (1998-04-02) Abbildung 1	1-7
X	US 5 198 115 A (STALLING DAVID L ET AL) 30. März 1993 (1993-03-30) Spalte 1, Zeile 7-21 Spalte 14, Zeile 14 - Spalte 17, Zeile 23	1-7
A	US 5 670 054 A (KIBBEY CHRISTOPHER EDMUND ET AL) 23. September 1997 (1997-09-23) das ganze Dokument	1,5
<input type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 31. Januar 2000		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 07/02/2000
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Müller, T

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07542

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9813118 A	02-04-1998	DE 19641210 A DE 29617376 U EP 0946236 A	02-04-1998 21-11-1996 06-10-1999
US 5198115 A	30-03-1993	KEINE	
US 5670054 A	23-09-1997	AU 2601597 A WO 9738303 A	29-10-1997 16-10-1997



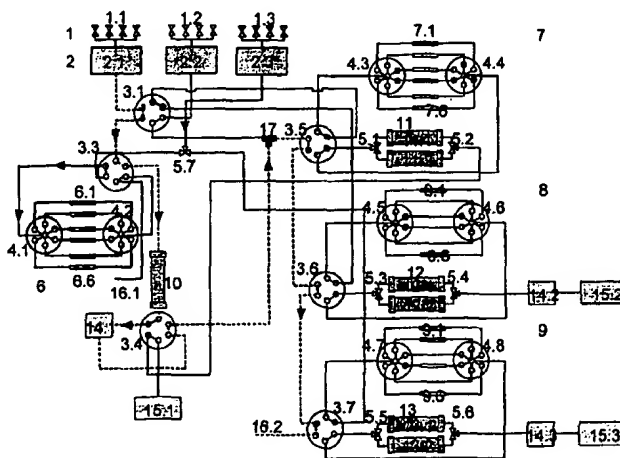
<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G01N 30/46, B01D 15/08</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/22429</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. April 2000 (20.04.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/07542</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 8. Oktober 1999 (08.10.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 47 439.3 8. Oktober 1998 (08.10.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): AN-ALYTICON AG [DE/DE]; Biotechnologie – Pharmazie, Tegeler Weg 33, D-10589 Berlin (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜLLER-KUHRT, Lutz [DE/DE]; Wublitzweg 12 A, D-14089 Berlin (DE). GUMM, Holger [DE/DE]; Schönbaumer Weg 12, D-13503 Berlin (DE). NOTZKE, Holger [DE/DE]; Strasse 345 Nr. 6, D-13591 Berlin (DE). GOD, Ralf [DE/DE]; Seehofstrasse 52 D-14167 Berlin (DE).</p> <p>(74) Anwälte: GULDE, Klaus, W. usw.; Gulde Hengelhaupt Ziebig, Schützenstrasse 15-17, D-10117 Berlin (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</p>

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR THE RAPID LIQUID CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF SUBSTANCE MIXTURES AND FOR THE IDENTIFICATION OF SUBSTANCES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR SCHNELLEN FLÜSSIGCHROMATOGRAPHISCHEN TRENNUNG VON SUBSTANZGEMISCHEN UND IDENTIFIZIERUNG VON SUBSTANZEN

(57) Abstract

The invention relates to a method and device for the rapid liquid chromatographic separation of substance mixtures and for the identification of substances. The aim of the invention is to provide a device and a method for the liquid chromatographic separation, isolation, and identification of substances in analytic and semipreparative areas, with which a test for determining the activity of substance mixtures is dispensed with. In addition, the inventive method and device carry out the separation of substance mixtures, and the isolation and identification of the individual substances more quickly than prior art methods and devices. To these ends, a method and device are used with which substance mixtures, in a software-controlled rapid liquid chromatographic two-step separation, are subjected to a preliminary separation in a first step and, in the second step, the fractions which were subjected to the preliminary separation and which are deposited in collection columns are parallelly separated into at least two separation lines in a fine manner. The finely separated fractions are parallelly identified and parallelly isolated.



(57) Zusammenfassung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Vorrichtung zur schnellen flüssigchromatographischen Trennung von Substanzgemischen und Identifizierung von Substanzen. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur flüssigchromatographischen Trennung, Isolierung und Identifizierung von Substanzen im analytischen und semipräparativen Bereich anzubieten, mit denen sich ein Test auf Wirkung von Substanzgemischen erübrigt und es schneller als bisher möglich ist, Substanzgemische aufzutrennen, die Einzelsubstanzen zu isolieren und zu identifizieren. Die Lösung der Aufgabe erfolgt mit einem Verfahren und einer Vorrichtung, bei denen Substanzgemische in einer softwaregesteuerten schnellen flüssigchromatographischen Zweistufentrennung in der ersten Stufe vorgetrennt und in der zweiten Stufe die vorgetrennten und in Auffangssäulen abgelegten Fraktionen in mindestens zwei Trennlinien parallel fein aufgetrennt, die fein aufgetrennten Fraktionen parallel identifiziert und parallel isoliert werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshon	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**Verfahren und Vorrichtung zur schnellen
flüssigchromatographischen Trennung von
Substanzgemischen und Identifizierung von Substanzen**

Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine
Vorrichtung zur schnellen flüssigchromato-graphischen
Trennung von Substanzgemischen und Identifizierung
von Substanzen gemäß den Oberbegriffen der Ansprüche
1 und 5.

Beispielsweise steht in der pharmazeutischen
Forschung häufig das Problem aus Substanzgemischen
pharmazeutisch aktive Stoffe zu isolieren. So werden
Naturstoffextrakte oder auch durch kombinatorische
Chemie erzeugte Substanzgemische auf eine mögliche
Wirksamkeit getestet. Aus Substanzgemischen die eine
Wirksamkeit gezeigt haben, wird dann versucht die
wirksamen Substanzen mit Hilfe von aufwendigen
Trennverfahren zu isolieren. Danach werden die so
isolierten Einzelsubstanzen des Gemisches einem
erneuten Wirkungstest unterzogen. Die nun gefundenen
wirksamen Einzelsubstanzen werden auf ihre Struktur
hin untersucht, um möglicherweise bereits bekannte
Wirkstoffe auszuschließen. Ein Nachteil dieses
Verfahrens ist, daß bei dem Test der Substanzgemische
durch Überlagerungseffekte die Wirksamkeit von
Einzelsubstanzen unterdrückt werden kann und diese so
unerkannt bleiben. Ein weiterer Nachteil ist, daß
durch Überlagerungseffekte eine Wirksamkeit
vorgetäuscht werden kann und anschließend

kostenintensiv vergeblich nach diesen vermeintlichen Wirkstoffen im Substanzgemisch gesucht wird. Schließlich erfolgt nachteiligerweise der Ausschluß bereits bekannter Substanzen erst nach der
5 Durchführung von mindestens zwei Tests auf biologische Wirksamkeit und nach aufwendigen Isolationsverfahren, was sehr kostspielig ist. Zur Durchführung dieser Tests sind in der Regel große Substanzmengen nötig, d. h., daß Trennungen im
10 präparativen Maßstab zu erfolgen haben. Präparative Anlagen sind aber von den Investitionskosten her teurer als analytische Anlagen. Ebenso verbrauchen präparative Anlagen zur Trennung erheblich mehr Lösungsmittel und Puffersubstanzen, was ihren Betrieb
15 teuer macht und zusätzlich größere Entsorgungsprobleme und Umweltbelastungen hervorruft.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur flüssig-
20 chromatographischen Trennung, Isolierung und Identifizierung von Substanzen im analytischen und semipräparativen Bereich anzubieten, mit denen sich ein Test auf Wirkung von Substanzgemischen erübrigt und es schneller als bisher möglich ist
25 Substanzgemische aufzutrennen, die Einzelsubstanzen zu isolieren und zu identifizieren.

Die Lösung der Aufgabe erfolgt mit den kennzeichnenden Teilen der Ansprüche 1 und 5.

30 Vorteilhafte Weiterbildungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

Die Erfindung weist verschiedene Vorteile auf. Die Substanzen müssen nicht mehr doppelt, nämlich vorher im Substanzgemisch und nach der Isolierung getestet werden. Erfindungsgemäß kann der aufwendige und kostspielige und zum Teil fehlerbehaftete erste Wirkungstest der Substanzgemische entfallen. Statt dessen werden nach der kombinierten Isolierung und Identifikation nur potentiell neue Wirksubstanzen weiteren Tests unterzogen. Die bisher übliche kostspielige Bearbeitung bereits bekannter Substanzen entfällt. Der Zeit- und Kostenaufwand für die Ermittlung einer neuen Wirksubstanz kann erheblich reduziert werden. Zusätzlich ist diese Verfahrensweise sicherer, denn die Testergebnisse an unbekannten Einzelsubstanzen sind eindeutig und alle im Gemisch vorhandenen Wirksubstanzen werden auch erfaßt.

Die zu untersuchenden Substanzgemische werden in einer zweistufigen Trennung bearbeitet, dabei können durch die erfindungsgemäße Verschaltung von Trennsäulen und Festphasenextraktionssäulen (Auffangsäulen) mit der Pumpeneinheit in der zweiten chromatographischen Trennstufe mehrere Fraktionen aus dem ersten Trennungsschritt parallel getrennt werden. Somit arbeitet diese Vorrichtung erheblich schneller und damit kostengünstiger als bekannte zweistufige Vorrichtungen.

Die Identifikation der Einzelsubstanzen erfolgt durch an sich bekannten direkten computergesteuerten Vergleich der von Detektoren gewonnenen Chromatogrammen und Spektren sowie des Retentionsbereiches aus dem ersten Trennschritt und der

Retentionszeit aus dem zweiten Trennschritt mit Informationen über bekannte Substanzen in einer Datenbank. Als Detektions- und Identifikationsprinzipien sind Ultraviolett-Absorption, Massenspektrometrie, Lichtstreuung, Fluoreszenz, Infrarotspektroskopie und Kernspinresonanzspektroskopie möglich. Die Einbeziehung weiterer Identifizierungsparameter wie z. B. Quelle und Herkunft der Probe ist möglich. Da weniger Tests zur Identifizierung der Substanzen im Gemisch und zum Ausschluß bereits bekannter Substanzen notwendig sind, kann diese Anlage im analytischen und semipräparativen Maßstab dimensioniert sein. Analytische und semipräparative Anlagen sind in der Anschaffung und im Betrieb wesentlich kostengünstiger als die bisher üblichen präparativen Anlagen. Durch den geringeren Lösungsmittel- und Puffersubstanzenverbrauch ist das erfindungsgemäße Verfahren und die Vorrichtung aufgrund geringerer Abfallmengen umweltfreundlich.

Die Erfindung wird anhand einer Zeichnung und eines Ausführungsbeispieles näher erläutert.

Es zeigen

Fig. 1 eine schematische Darstellung des Ablaufes des Equilibrierens im ersten Trennschritt und Spülen der Aufgabesäulenbatterie,

Fig. 2 eine schematische Darstellung des Auftrennens eines Substanzgemisches im ersten Trennschritt und Adsorption von Fraktionen an der ersten Auffangsäulenbatterie,

- Fig. 3 eine schematische Darstellung des Auftrennens eines Substanzgemisches im ersten Trennschritt und Adsorption von Fraktionen an der zweiten Auffangssäulenbatterie,
- 5 Fig. 4 eine schematische Darstellung des Auftrennens eines Substanzgemisches im ersten Trennschritt und Adsorption von Fraktionen an der dritten Auffangssäulenbatterie,
- 10 Fig. 5 eine schematische Darstellung der Equilibrierung der Trennsäulenbatterien des zweiten Trennschrittes,
- 15 Fig. 6 eine schematische Darstellung einer parallelen Trennung absorbierter Fraktionen im zweiten Trennschritt und
- 20 Fig. 7 eine schematische Darstellung des Equilibrierens einer Auffangssäulenbatterie.

Fig. 1 bis Fig. 7 zeigen beispielhaft den Aufbau und das Ablaufschema einer erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einer Trennsäule und drei nachgeordneten Trennlinien.

25

Eine Pumpeneinheit 2, die aus drei Pumpen 2.1 bis 2.3 besteht, ist über die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.1 und 3.3 sowie dem 3-Wege-2-Positions-Ventil 5.7 mit einer Aufgabesäulenbatterie 6, einer Trennsäule 10, für die erste Trennungsstufe und einer zweiten Trennstufe, die aus drei parallel betreibbaren Trennlinien besteht, denen jeweils ein 6-Wege-2-Positions-Ventil 3.5, 3.6 und 3.7 vorgeordnet ist,

30

verbunden. Damit ist es möglich, die mobile Phase in jeder gewünschten Zusammensetzung nacheinander und parallel in alle Bereiche der Vorrichtung zu transportieren.

5

Jede Trennlinie weist eine Auffangssäulenbatterie 7, 8 und 9 und eine Trennsäulenbatterie 11, 12 und 13 auf. Beispielfhaft enthält die Auffangssäulenbatterie 7 die Auffangssäulen 7.1 bis 7.6 und die Trennsäulenbatterie 11 die Trennsäulen 11.1 und 11.2. Die beiden weiteren dargestellten Trennlinien sind identisch aufgebaut. Andere Varianten mit mehr Aufgabesäulen 6.1 bis 6.6 der Aufgabesäulenbatterie 6, mehrerer Trennsäulen 10, mehr als drei Auffangssäulenbatterien 7, 8 und 9 mit jeweils mehr als sechs Auffangssäulen und mehr als drei Trennsäulenbatterien 11, 12 und 13 mit mehr als sechs Trennsäulen pro Batterie sind möglich.

Im folgenden wird der Ablauf des erfindungsgemäßen Verfahrens beispielhaft beschrieben. Substanzgemischproben werden jeweils in einem Lösungsmittel gelöst und mit einem Adsorbenten versetzt. Anschließend wird das Lösungsmittel mittels eines Rotationsverdampfers entfernt, damit die mit Probenmaterial belegten Adsorbenten rieselfähige Eigenschaften erreichen. Die mit dem Substanzgemisch belegten Adsorbenten werden in die Aufgabesäulen 6.1 bis 6.6 der Aufgabesäulenbatterie 6 verfüllt und in die Aufgabesäulenbatterie 6 eingebaut. Die nun folgenden Programmablaufschritte werden über eine Software gesteuert.

30

Gemäß Fig. 1 wird die Trennsäule 10 equilibriert. Parallel dazu wird die Luft aus der

Aufgabesäulenbatterie 6 entfernt. Über die Pumpe 2.3, das 3-Wege-2-Positions-Ventil 5.7 und über die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.1 und 3.3 wird mit Wasser die Luft aus einer der trocken verfüllten Aufgabesäulen 6.1 bis 6.6 entfernt, die als nächstes injiziert werden soll. Gleichzeitig wird über die Pumpe 2.1, die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.1 und 3.3 die Trennsäule 10 mit einem geeigneten Laufmittel equilibriert.

In Fig. 2 ist das Auftrennen des Substanzgemisches in der ersten Trennstufe an der Trennsäule 10 und die anschließende Adsorption der Fraktionen in einer Trennlinie mit den Auffangssäulen 7.1 bis 7.6 der Auffangssäulenbatterie 7 dargestellt.

Wenn die Luft aus einer der Aufgabesäulen 6.1 bis 6.6 entfernt ist, wird das Trennprogramm gestartet. Zunächst werden die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.3 und 3.5 geschaltet. Über eine Niederdruckventileinheit 1 mit den Niederdruckventilen 1.1 bis 1.3 können die Bestandteile der mobilen Phase mittels der Pumpeneinheit 2 in das System eingegeben werden. Über das Niederdruckventil 1.1 der Pumpe 2.1 und die Pumpe 2.1 wird mobile Phase transportiert, wobei dieses System sowohl isokratisch als auch mit einem Gradienten gefahren werden kann. Über das 6-Wege-2-Positions-Ventil 3.3 und die 7-Wege-6-Positions-Ventile 4.1/4.2 wird die mobile Phase von Pumpe 2.1 auf diejenige Aufgabesäule 6.1 bis 6.6 geführt, von der Probenmaterial bearbeitet werden soll. Von einer der Aufgabesäulen 6.1 bis 6.6 wird die zu trennende Probe auf die Trennsäule 10 überführt. Die aus der Trennsäule 10 austretenden

getrennten Probekomponenten gelangen über ein 6-Wege-2-Positions-Ventil 3.4 und den Detektor 14.1 zu einem T-Stück 17, wo über die Pumpe 2.2 und das 6-Wege-2-Positions-Ventil 3.1 Wasser der mobilen Phase
5 zugemischt wird. Die Menge des zugemischten Wassers richtet sich dabei nach der Polarität der zu trennenden Substanzen. Die durch Wasser erhöhte Polarität der mobilen Phase ermöglicht nun die Adsorption auf den Auffangssäulen 7.1 bis 7.6 der
10 Auffangssäulenbatterie 7. Über das 6-Wege-2-Positions-Ventil 3.5 wird zunächst auf die Auffangssäulenbatterie 7 adsorbiert. Dabei werden nacheinander die Auffangssäulen 7.1 bis 7.6 mit Fraktionen belegt.

15 In Fig. 3 ist die Adsorption weiterer Fraktionen an den Auffangssäulen 8.1 bis 8.6 der Auffangssäulenbatterie 8 dargestellt. Wenn alle Auffangssäulen der Auffangssäulenbatterie 7 mit Fraktionen belegt
20 sind, schalten die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.5 und 3.6 die Auffangssäulenbatterie 8 in den Eluentenstrom. Nun werden nacheinander die Auffangssäulen 8.1 bis 8.6 mit Fraktionen belegt.

25 In Fig. 4 ist die Adsorption von Fraktionen an die Auffangssäulen 9.1 bis 9.6 der Auffangssäulenbatterie 9 dargestellt. Wenn alle Auffangssäulen 8.1 bis 8.6 der Auffangssäulenbatterie 8 mit Fraktionen belegt sind, schalten die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.6 und 3.7
30 die Auffangssäulenbatterie 9 in den Eluentenstrom. Nun werden nacheinander die Auffangssäulen 9.1 bis 9.6 mit Fraktionen belegt. In dem folgenden Ablaufschritt werden parallel die an den drei Auffangssäulenbatterien 7, 8 und 9 adsorbierten Fraktionen

eluiert und auf entsprechend zugeordnete Trennsäulenbatterien 11, 12 und 13 weiter aufgetrennt.

5 Vor jeder Trennung werden die Trennsäulenbatterien 11, 12 und 13 equilibriert. In Fig. 5 ist die Equilibrierung der Trennsäulenbatterien 11, 12 und 13 dargestellt. Zur Equilibrierung wird mobile Phase über die Pumpe 2.1 das 6-Wege-2-Positions-Ventil 3.1 und 3.5 auf die Trennsäulen 11.1 bzw. 11.2 der
10 Trennsäulenbatterie 11 geführt. Von dort wird die mobile Phase über das 6-Wege-2-Positions-Ventil 3.4 den Detektor 14.1 und einem Fraktionssammler 15.1 in den Abfall geführt. Parallel dazu werden die
15 Trennsäulen 12.1 und 12.2 der Trennsäulenbatterie über die Pumpe 2.2 die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.1 und 3.6 sowie einen Detektor 14.2 und Fraktionssammler 15.2 equilibriert. Ebenso werden dazu parallel die Trennsäulen 13.1 und 13.2 über die
20 Pumpe 2.3 das 6-Wege-2-Positions-Ventil 3.7 und das 3-Wege-2-Positions-Ventil 5.7 sowie einen Detektor 14.3 und einen Fraktionssammler 15.3 equilibriert.

In Fig.6 ist die parallele Trennung der an den
25 Auffangsäulenbatterien 7, 8 und 9 adsorbierten Fraktionen auf den Trennsäulenbatterien 11, 12 und 13 dargestellt. Zur Einleitung des Trennschrittes wird mobile Phase über die Pumpe 2.1 der Pumpeneinheit 2 und die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.1 und 3.5 auf
30 die Auffangsäulenbatterie 7 geführt. Die erste eluierte Fraktion aus der Auffangsäulenbatterie 7 (z. B. von Auffangsäule 7.1) wird über das 6-Wege-2-Positions-Ventil 3.5 zur Trennsäulenbatterie 11 geleitet. Dort kann wahlweise softwaregesteuert eine

der Trennsäulen 11.1 oder 11.2 zugeschaltet werden.
Die getrennten Komponenten werden dann anschließend
über die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.5 und 3.4 zum
Detektor 14.1 geführt. Die Software in der
5 elektronischen Steuereinheit wertet die Signale mit
Hilfe von Peakerkennung aus und lenkt die getrennten
Komponenten in die entsprechenden Vials des
Fraktionssammlers 15.1. Gleichzeitig ist auch eine
Zeitsteuerung des Fraktionssammlers 15.1 möglich.
10 Diese Zeitsteuerung kann automatisch aktiviert
werden, wenn kein Peak den Detektor passiert.

Parallel dazu wird mobile Phase über die Pumpe 2.2
und die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.1 und 3.6 zur
15 Auffangssäulenbatterie 8 gefördert. Die erste eluierte
Fraktion aus der Auffangssäulenbatterie 8 (z. B. von
der Auffangssäule 8.1) wird über das 6-Wege-2-
Positions-Ventil 3.6 zur Trennsäulenbatterie 12
geleitet. Dort kann wahlweise softwaregesteuert eine
20 der Trennsäulen 12.1 oder 12.2 zugeschaltet werden.
Die getrennten Komponenten werden zum Detektor 14.2
geführt. Die Software wertet auch hier die Signale
mit Hilfe von Peakerkennung aus und lenkt dann die
getrennten Komponenten in die entsprechenden Vials
25 des Fraktionssammlers 15.2. Auch dieser
Fraktionssammler 15.2 kann zeitgesteuert werden.
Diese Zeitsteuerung kann automatisch aktiviert
werden, wenn kein Peak den Detektor passiert.

30 Parallel zu den Abläufen in zwei Trennlinien wird die
dritte Trennlinie hinsichtlich der Einleitung des
Trennungsschrittes aktiviert. Dazu wird die mobile
Phase über Pumpe 2.3 sowie das 3-Wege-2-Positions-
Ventil 5.7 und das 6-Wege-2-Positions-Ventil 3.7 zur

Auffangssäulenbatterie 9 gefördert. Die erste eluierte Fraktion aus der Auffangssäulenbatterie 9 (z. B. von der Auffangssäule 9.1) wird über das Ventil 3.7 zur Trennsäulenbatterie 13 geleitet. Dort kann wahlweise
5 softwaregesteuert eine der Trennsäulen 13.1 oder 13.2 zugeschaltet werden. Die getrennten Komponenten werden zum Detektor 14.3 geführt. Die Steuerung des sich anschließenden Fraktionssammlers 15.3 erfolgt wie bereits beschrieben. Nachdem die jeweils ersten
10 Fraktionen parallel bearbeitet worden sind, erfolgt zur Vorbereitung und der Trennung der nächsten Fraktionen erneut Equilibrierung der Trennsäulenbatterien 11, 12 und 13 (vgl. Fig. 5). Anschließend schalten die 7-Wege-6-Positions-Ventile
15 4.3/4.4, 4.5/4.6 und 4.7/4.8 an den Auffangssäulenbatterien 7, 8 und 9 weiter, so daß nun die zweiten Fraktionen bearbeitet werden können, wie in Fig. 6 dargestellt. Diese Vorgänge setzen sich solange fort bis alle Fraktionen bearbeitet worden
20 sind.

Fig. 7 stellt das Equilibrieren der Auffangssäulen 7.1 bis 7.6 der Auffangssäulenbatterie 7 dar. In diesem Programmablaufschritt werden die Auffangssäulen 7.1
25 bis 7.6 mit Wasser gespült und so für den nächsten Lauf vorbereitet. Dies erfolgt sequentiell über die Pumpe 2.2, die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.1, 3.5, 3.6, 3.7 sowie die 7-Wege-6-Positions-Ventile 4.3/4.4 der Auffangssäulenbatterie 7. Das Equilibrieren der
30 Auffangssäulenbatterien 8 und 9 erfolgt analog. Die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.5 und 3.6 werden geschaltet und über die Pumpe 2.2 die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.1, 3.5, 3.6, 3.7 sowie die 7-Wege-6-Positionsventile 4.5/4.6 der Auffang-



säulenbatterie 8 erfolgt das Equilibrieren der Auffangssäulen 8.1 bis 8.6. Anschließend werden die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.6 und 3.7 geschaltet und über die Pumpe 2.2 die 6-Wege-2-Positions-Ventile 3.1, 3.5, 3.6, 3.7 sowie die 7-Wege-6-Positionsventile 4.7/4.8 der Auffangssäulenbatterie 9 erfolgt das Equilibrieren der Auffangssäulen 9.1 bis 9.6. Nach diesem Programmablauf werden die 7-Wege-6-Positions-Ventile 4.1/4.2 der Aufgabebatterie 6 auf die nächste Aufgabesäule (z. B. 6.2) geschaltet und der gesamte Programmablauf beginnt von vorn. (Ablaufschritt 1: Equilibrieren der Trennsäule 10 und Entlüften der Aufgabesäule 6.2, dargestellt in Fig. 1 usw.)

Nach Bearbeitung dieser zweiten Probe kann die folgende Aufgabesäule 6.3 in den Eluentenstrom geschaltet werden. Da bereits abgearbeitete Probeaufgabesäulen jederzeit durch neue ersetzt werden können, ist ein kontinuierlicher Betrieb mit einer unbegrenzten Anzahl von Proben möglich.

Während des ersten und zweiten Trennschrittes werden über die Detektoren 14.1, 14.2 und 14.3 Chromatogramme, Retentionsdaten und Spektren gesammelt, direkt in einem Rechner verarbeitet und mit den Daten bekannter Substanzen verglichen. Somit lassen sich bereits online bekannte Substanzen identifizieren und aussortieren. Im Zweifelsfall können noch weitere Daten, die offline nach Trennung und Isolierung gewonnen werden, zur Identifikation herangezogen werden.



Bezugszeichenliste

5	1	Niederdruckventileinheit
	1.1	Niederdruckventil
	1.2	Niederdruckventil
	1.3	Niederdruckventil
10	2	Pumpeneinheit
	2.1	Pumpe
	2.2	Pumpe
	2.3	Pumpe
	3	6-Wege-2-Positions-Ventil
15	3.1	6-Wege-2-Positions-Ventil
	3.3	6-Wege-2-Positions-Ventil
	3.4	6-Wege-2-Positions-Ventil
	3.5	6-Wege-2-Positions-Ventil
	3.6	6-Wege-2-Positions-Ventil
20	3.7	6-Wege-2-Positions-Ventil
	4	7-Wege-6-Positions-Ventil
	4.1	7-Wege-6-Positions-Ventil
	4.2	7-Wege-6-Positions-Ventil
	4.3	7-Wege-6-Positions-Ventil
25	4.4	7-Wege-6-Positions-Ventil
	4.5	7-Wege-6-Positions-Ventil
	4.6	7-Wege-6-Positions-Ventil
	4.7	7-Wege-6-Positions-Ventil
	4.8	7-Wege-6-Positions-Ventil

- 5 3-Wege-2-Positions-Ventil
- 5.1 3-Wege-2-Positions-Ventil
- 5.2 3-Wege-2-Positions-Ventil
- 5.3 3-Wege-2-Positions-Ventil
- 5 5.4 3-Wege-2-Positions-Ventil
- 5.5 3-Wege-2-Positions-Ventil
- 5.6 3-Wege-2-Positions-Ventil
- 5.7 3-Wege-2-Positions-Ventil
- 6 Aufgabesäulenbatterie
- 10 5.1 Aufgabesäule
- 5.2 Aufgabesäule
- 5.3 Aufgabesäule
- 5.4 Aufgabesäule
- 5.5 Aufgabesäule
- 15 5.6 Aufgabesäule
- 7 Auffangsäulenbatterie
- 7.1 Auffangsäule
- 7.2 Auffangsäule
- 7.3 Auffangsäule
- 20 7.4 Auffangsäule
- 7.5 Auffangsäule
- 7.6 Auffangsäule
- 8 Auffangsäulenbatterie
- 8.1 Auffangsäule
- 25 8.2 Auffangsäule
- 8.3 Auffangsäule
- 8.4 Auffangsäule
- 8.5 Auffangsäule
- 8.6 Auffangsäule
- 30 9 Auffangsäulenbatterie
- 9.1 Auffangsäulen
- 9.1 Auffangsäulen
- 9.2 Auffangsäulen
- 9.3 Auffangsäulen
- 35 9.4 Auffangsäulen

	9.5	Auffangsäulen
	9.6	Auffangsäulen
	10	Trennsäule
	11	Trennsäulenbatterie
5	11.1	Trennsäule
	11.2	Trennsäule
	12	Trennsäulenbatterie
	12.1	Trennsäule
	12.2	Trennsäule
10	13	Trennsäulenbatterie
	13.1	Trennsäule
	13.2	Trennsäule
	14	Detektoren
	14.1	Detektor
15	14.2	Detektor
	14.3	Detektor
	15	Fraktionssammler
	15.1	Fraktionssammler
	15.2	Fraktionssammler
20	15.3	Fraktionssammler
	16	Abfall
	16.1	Abfall
	16.2	Abfall
25	17	T-Stück
30		
35		



Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur schnellen flüssig-
chromatographischen Trennung und Identifizierung
von Substanzen
dadurch gekennzeichnet, daß
10 Substanzgemische in einer softwaregesteuerten
schnellen flüssigchromatographischen Zweistufen-
trennung in der ersten Stufe vorgetrennt und in
der zweiten Stufe die vorgetrennten und in
Auffangssäulen abgelegten Fraktionen in mindestens
15 zwei Trennlinien parallel fein aufgetrennt, die
fein aufgetrennten Fraktionen parallel
identifiziert und parallel isoliert werden.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
in der ersten Trennstufe die Vortrennung von
Substanzgemischen nacheinander und in der zweiten
Stufe die Feintrennung nacheinander und/oder
25 parallel erfolgt.
- 30 3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, daß
mindestens ein Detektor (14.1) sowohl nach der
ersten Trennstufe als auch nach der zweiten
Trennstufe genutzt wird.
- 35 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, daß
die in den Trennlinien aufgetrennten und
isolierten Substanzen einer weiteren Reinigungs-
prozedur insbesondere einer adsorptiven Reinigung
unterzogen werden.



5. Vorrichtung zur schnellen flüssigchromatischen Trennung und Identifikation von Substanzen bestehend aus mehreren Trenn- und Auffangssäulen sowie Aufgabesystemen Detektoren- und Fraktionssammler, deren Zusammenwirken über eine zentrale Steuereinheit steuerbar ist, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer Trennsäule (10) mehrere parallele flüssigchromatographische Trennlinien, bestehend aus je einer Kombination von Trennsäulenbatterien (11, 12, 13) mit Auffangssäulenbatterien (7, 8, 9), Detektoreinheiten (14) und Fraktioniersammlereinheiten (15), nachgeordnet sind, daß eine Pumpeneinheit (2) bestehend aus drei Pumpen (2.1, 2.2, 2.3) zur Förderung der mobilen Phase sowohl mit der Trennsäule (10) als auch mit den Trennlinien funktionell verbunden ist und daß softwaremäßig schaltbare Mehrwegeventile zwischen den einzelnen Funktionseinheiten angeordnet sind.
6. Vorrichtung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß vor jeder Trennlinie je ein Mehrwegeventil (3.5, 3.6, 3.7) angeordnet ist.
7. Vorrichtung nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß den Trennlinien nachgeschaltet weitere Auffangssäulen angeordnet sind.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07542

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N30/46 B01D15/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N B01D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 13118 A (GUMM HOLGER ;ANALYTICON AG BIOTECHNOLOGIE P (DE); MUELLER KUHR T LU) 2. April 1998 (1998-04-02) Abbildung 1	1-7
X	US 5 198 115 A (STALLING DAVID L ET AL) 30. März 1993 (1993-03-30) Spalte 1, Zeile 7-21 Spalte 14, Zeile 14 -Spalte 17, Zeile 23	1-7
A	US 5 670 054 A (KIBBEY CHRISTOPHER EDMUND ET AL) 23. September 1997 (1997-09-23) das ganze Dokument	1,5

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

31. Januar 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

07/02/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Bevollmächtigter Bediensteter

Müller, T



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07542

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9813118 A	02-04-1998	DE 19641210 A DE 29617376 U EP 0946236 A	02-04-1998 21-11-1996 06-10-1999
US 5198115 A	30-03-1993	KEINE	
US 5670054 A	23-09-1997	AU 2601597 A WO 9738303 A	29-10-1997 16-10-1997



PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts P46597PC-Gu	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/07542	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 08/10/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 08/10/1998
Anmelder ANALYTICON AG BIOTECHNOLOGIE-PHARMAZIE et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfasst insgesamt 2 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der Sprache ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.



A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDEGEGENSTANDES
 IPK 7 G01N30/46 B01D15/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 G01N B01D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 13118 A (GUMM HOLGER ; ANALYTICON AG BIOTECHNOLOGIE P (DE); MUELLER KUHRT LU) 2. April 1998 (1998-04-02) Abbildung 1	1-7
X	US 5 198 115 A (STALLING DAVID L ET AL) 30. März 1993 (1993-03-30) Spalte 1, Zeile 7-21 Spalte 14, Zeile 14 - Spalte 17, Zeile 23	1-7
A	US 5 670 054 A (KIBBEY CHRISTOPHER EDMUND ET AL) 23. September 1997 (1997-09-23) das ganze Dokument	1,5

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Stehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

31. Januar 2000

Abmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

07/02/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3018

Bevollmächtigter Bediensteter

Müller, T



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/07542

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9813118	A	02-04-1998	DE 19641210 A DE 29617376 U EP 0946236 A	02-04-1998 21-11-1996 06-10-1999
US 5198115	A	30-03-1993	NONE	
US 5670054	A	23-09-1997	AU 2601597 A WO 9738303 A	29-10-1997 16-10-1997



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

REC'D 07 FEB 2001

WIPO PCT

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

T17



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts P46597PC-Gu	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07542	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 08/10/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 08/10/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N30/46		
Anmelder SEPIATEC GmbH et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 08/05/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 29. 01. 01
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Müller, T Tel. Nr. +49 89 2399 2285 

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-15 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-7 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/7-7/7 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-7
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-7
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-7
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: WO-A-9813118

D2: US-A-5198115

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Technisches Gebiet:

Die Anmeldung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur schnellen flüssigchromatographischen Trennung von Substanzgemischen und zur Identifizierung von Substanzen, insbesondere bei der Isolation von pharmazeutisch aktiven Stoffen und bei Naturstoffextrakten.

Problem:

Der Anmeldung liegt das Problem zugrunde, ein schnelleres Verfahren und eine entsprechende Vorrichtung zu schaffen, wobei ein erster Wirkungstest von Substanzen entfallen kann.

Lösung:

Die Aufgabe wird durch eine softwaregesteuerte Zweistufentrennung gemäß Ansprüchen 1 und 5 gelöst.

Neuheit:

D1 offenbart eine Vorrichtung und ein Verfahren zur schnellen flüssigchromatographischen Trennung von Substanzen (Seite 4, Zeilen 6-15).

Die zu trennende Mischung wird in eine Aufgabesäule 1 verfüllt. Mehrere Trennlinien, bestehend aus Trennsäulen, Auffangssäulen und Fraktioniersammeleinheiten, Pumpen und Mehrwegeventile werden so geschaltet, daß gleichzeitig auf Fraktioniersäulen fraktioniert wird und auch Fraktioniersäulen gespült werden (Seite 8, Zeile 4 - 8).

Daher ist der Gegenstand der Ansprüche 1-7 nicht neu gegenüber dem aus D1

bekannten Stand der Technik.

D2 offenbart ebenfalls ein System, in dem eine Probe in einer großen Anzahl von parallelen Trennprozessen getrennt wird (Spalte 1, Zeile 7-21; Spalte 14, Zeile 14 - Spalte 17, Zeile 23). Daher ist der Gegenstand der Ansprüche 1-7 auch nicht neu gegenüber D2.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P46597PC-Gu	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/07542	International filing date (<i>day/month/year</i>) 08 October 1999 (08.10.99)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 08 October 1998 (08.10.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 30/46, B01D 15/08		
Applicant SEPIATEC GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 08 May 2000 (08.05.00)	Date of completion of this report 29 January 2001 (29.01.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/07542

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

☒ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-15, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.

☒ the claims, Nos. 1-7, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. _____, filed with the letter of _____,
Nos. _____, filed with the letter of _____.

☒ the drawings, sheets/fig 1/7-7/7, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims		YES
	Claims	1-7	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-7	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-7	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

This report makes reference to the following documents:

D1 WO-A-98 13 118

D2 US-A-51 98115.

Technical field

The application relates to a method and a device for rapid fluid chromatography separation of substance mixtures and for identification of substances, in particular when pharmaceutically active substances are isolated and for natural substance extracts.

Problem

The invention addresses the problem of creating a more rapid method and a corresponding device, a first activity test of substances not being required.

Solution

The problem is solved by software-controlled two-stage separation according to Claims 1 and 5.

Novelty

D1 discloses a device and a method for rapid fluid

chromatography separation of substances (page 4, lines 6-15).

The mixture to be separated is filled into a feed column 1. A plurality of separation lines comprising separation columns, collection columns and fractionating and collecting units, pumps and multi-way valves are connected in such a manner that at the same time there is fractionation on fractionating columns and fractionating columns are also rinsed (page 8, lines 4-8).

Consequently, the subject matter of Claims 1-7 is not novel over the prior art known from D1.

D2 also discloses a system in which a sample is separated in a large number of parallel separation processes (column 1, lines 7-21; column 14, line 14 to column 17, line 23). Consequently, the subject matter of Claims 1 to 7 is also not novel over D2.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 08 June 2000 (08.06.00)	
International application No. PCT/EP99/07542	Applicant's or agent's file reference P46597PC-Gu
International filing date (day/month/year) 08 October 1999 (08.10.99)	Priority date (day/month/year) 08 October 1998 (08.10.98)
Applicant MÜLLER-KUHRT, Lutz et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

08 May 2000 (08.05.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Nestor Santesso
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

GULDE, Klaus, W.
Gulde Hengelhaupt Ziebig
Schützenstrasse 15-17
D-10117 Berlin
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 28 August 2000 (28.08.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference P46597PC-Gu	
International application No. PCT/EP99/07542	International filing date (day/month/year) 08 October 1999 (08.10.99)

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor	<input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address ANALYTICON AG Biotechnologie - Pharmazie Tegeler Weg 33 D-10589 Berlin Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the person	<input checked="" type="checkbox"/> the name	<input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence
Name and Address SEPIATEC GMBH Gross-Berliner Damm 71 D-12487 Berlin Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned	
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Aino Metcalfe
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

